



TITLE:

大腸菌のdnaA遺伝子部位の解析：
形質導入ファージλdnaAのDNA構
造と形質導入断片由来の蛋白質(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

村上, 昭

CITATION:

村上, 昭. 大腸菌のdnaA遺伝子部位の解析：形質導入ファージλdnaAのDNA構造と形質導入断片由来の蛋白質. 京都大学, 1981, 理学博士

ISSUE DATE:

1981-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2516>

RIGHT:

大腸菌のdna A遺伝子部位の解析.

—形質導入スーパ λ dna AのDNA構造と
形質導入断片由来の蛋白質

村上昭

主論文

D-32

新 制
理
3 65
京大 附 図

大腸菌の *dna A* 遺伝子部位の解析.

— 形質導入フージ λ *dna A* の DNA 構造と
形質導入断片由来の蛋白質

村上 昭.

目次

序章

1

第1章

dnaA 形質導入スーツの単離とそのDNA 9

上での *tnaA*, *dnaA* 及び *recF* 遺伝子部位の同定.

第2章

dnaA 遺伝子近傍のDNAから合成される 32

蛋白質の同定.

第3章

考察

49

謝辞

54

引用文献

55

付章

材料と方法

60

序章

DNA複製の分子機構の解明を目指した研究は、いっけゆる分子生物学が興った初期から、大腸菌を中心としたバクテリア、或るいはバクテリアファージを材料として行なわれてきた。1963年 Jacob et al. によって、DNA複製に関する最も基本的なモデル「レプリコンモデル」が提唱された。バクテリアやファージ等の染色体は、複製において1つの単位—レプリコンと名付けられた—を成しているとし、各レプリコンに、自身の複製を制御する二つの要素を認定した。複製開始を促すイニシエーターの合成を支配する遺伝子と、イニシエーターが認識するためのレプリケーターである。このモデルは概念として、広く受け容れられ、以後今日までの研究は、分子レベルの更なる解明に向か、て進んでいる。

DNA複製は、開始・複製鎖の伸長・終結の3段階に分けよことが出来る。環状の大腸菌

DNA の複製は、ilv 遺伝子 (イソロイシン・バリン合成に関与する遺伝子群) の近くから始まり、両方向に進み、ほぼ起点の反対側で終結する (Bird et al., 1970)。複製を開始する要因のうち、複製起点に関しては、制限酵素で切断した DNA 断片の中で、起点を含むものが同定された (Marsh and Worcel, 1977)。その断片は、プラスミドあるいは入子ファクターを用いて、クローニングされた (Yasuda and Hirota, 1977; von Meyenberg et al., 1978; Miki et al., 1978)。更に、起点部分の塩基配列も決定されている (Sugimoto et al., 1979; Meijer et al., 1979)。一方、他の開始因子としては、新たな蛋白質合成や RNA 合成が必要とされる (Lark and Renger, 1969; Lark, 1970)。また、分離された DNA 複製の温度感受性変異株の解析から、複製開始に関与する遺伝子群が同定されている。しかし、これらに関しては殆んど実態が掴めていない。

複製鎖の伸長の機構の解明では、大きな進展が見られた。大腸菌の DNA 複製鎖の伸長と

阻害する温度感受性変異株の多くは、同時に、 λ - ϕ プラスミドのDNA複製を阻害する。このことから、この段階は異なったレプリコンにおいても、共通の機構で進むと考えられる。従って、解析の容易な λ - ϕ プラスミドを材料として、生化学的にDNA合成の様式や関連する酵素等が解析されてきた。1968年には「岡崎フラグメント」の発見(Okazaki et al., 1968)によって、DNAの不連続複製のモデルが提出された。そして、Kornberg のグループによって、一本鎖DNA λ - ϕ M13 ϕ X174 のDNAとRF(replicative form)に変換する活性をもつ無細胞系が開発された(Wickner et al., 1972)。更に、Sakakibara and Tomizawa (1974) が、二本鎖の ColE1 DNA の無細胞系での複製に成功して以来、分子機構の解明は飛躍的に発展した。特に、Kornberg のグループと Herwitz のグループは、 ϕ X174 の無細胞系での複製において、前述の大腸菌のDNA複製の変異株における欠損を補う因子、という形で次々と新しい蛋白質を精製し、やがて

の機能をも明きらかにして来た。現在では、精製した各蛋白質因子の混合系で、 $\phi\times 174$ のDNA複製は進行し、その分子機構のほぼ全容が明きらかとなっている。そして、これらの過程に関与している大腸菌の因子は、自身のDNA複製においても、基本的には同様の機能を果たしていると予想される。

DNA複製の終結に関しては、殆んど解析が行なわれていない。

上で述べたように、 $\phi\times 174$ 、プラスミド col E1 等のDNA複製は、全段階の分子機構がほぼ解明されている。そして、それはDNA複製の最も基本となる機構と思われる。次に問題となるのは、より高次の制御機構の解明であろう。DNA複製は細胞周期の非常に重要な段階であり、複製の開始は周期の中の大きな転換点である。従って、細胞における複製開始の調節は、高次の制御機構のもとに行なわれると予想される。このことは、次の点からも予測される。大腸菌のDNA複製の開始は、

dnaA, *dnaI*, *dnaP* 遺伝子群の何らかの支配を受ける。しかし、これらの遺伝子は、細胞周期とは無関係な、スーパ等には必要とされないものである。

先に触れたように、現在、大腸菌の DNA 複製の開始機構に関しては、殆んど不明である。Jacob の提唱したレプリコン・モデルと筆頭に、数多くのモデルが提出されているが、仮説の域を出たものはない。複製開始機構を解明するための一つとして、開始に関与する因子の性状を明らかにしていくという方向がある。

前述のように、大腸菌の DNA 複製の開始に関与すると同定された一群の遺伝子がある――

dnaA, *dnaB*, *dnaC*, *dnaI*, *dnaP* (Wechsler, 1978).
この中で、*dnaA* 遺伝子は、複製起点の近くに位置し (Hirota et al., 1968)、複製の開始に特異的な役割を果たす (Hirota et al., 1970) ことから、この遺伝子産物は、レプリコン・モデルのイニシエーターに対応するものかもしれないと推定されている。従って、最も多数の条件致死変

異株が単離されていゝ (Kohiyama et al., 1966; Abe and Tomizawa, 1971; 他). それらを用いて、複製開始における *dnaA* 遺伝子の役割の解析が、多数報告されている。最近の主なものを掲げると、(i) *dnaA46* 温度感受性変異は、*rpob* 遺伝子 (RNAポリメラーゼβサブユニットの構造遺伝子) の変異のいくつかによつてサプレスされる — *dnaA* 遺伝子産物は、RNAポリメラーゼと相互作用し、複製開始時の RNA 合成に関与するかもしれない (Bagdasarian et al., 1977)、(ii) *dnaA46* 変異株では、許容温度と非許容温度との中間温度での増殖において、複製開始能が高積する — *dnaA* 遺伝子産物は、自己の合成に対してはネガティブな制御機能を持ち、複製開始に対してはポジティブに作用すると考えると説明がつく (Hansen and Rasmussen, 1977)、(iii) *dnaA46* 株から単離した、温度抵抗性かつ低温感受性株 (*dnaA cos* と名付けられた) は、低温で、DNA 複製が過剰に開始する — *dnaA* 遺伝子産物は、複製開始にポジティブに作用し、その量が開始頻

度と規定する」という解釈も可能である (Kellenberger-Guyer et al., 1977)、等である。ここに掲げたものを含めて、現在までに報告されているものは全て、間接的な実験に基づいて *dnaA* 遺伝子の役割を推定する」という段階のものである。次の段階として、*dnaA* 遺伝子産物を捕捉し、その機能を追求することが必要であろう。

dnaA 遺伝子は、大腸菌染色体上の 82.5 分付近に位置し (Backmann and Low, 1980)、興味深いことに、この領域には、DNA 複製あるいは合成に関与する遺伝子が並んでいる。 *dnaA* 遺伝子に続いて、修復型 DNA 合成に関与する *recF* 遺伝子 (Horii and Clark, 1973; Ganesan and Seawell, 1975)、次いで、DNA gyrase サブユニット B の構造遺伝子である *gyrB* 遺伝子 (Ryan, 1976; Mizuuchi et al., 1978)、そして、最近発見された、*dnaA* 遺伝子の極く近くに位置付けられた *dnaN* 遺伝子 (Sakakibara and Mizukami, 1980) である。本論文は、この領域を DNA 形質導入ファージと単離し、*dnaA* 遺伝子と始末とする遺伝子産物を解析したものである。

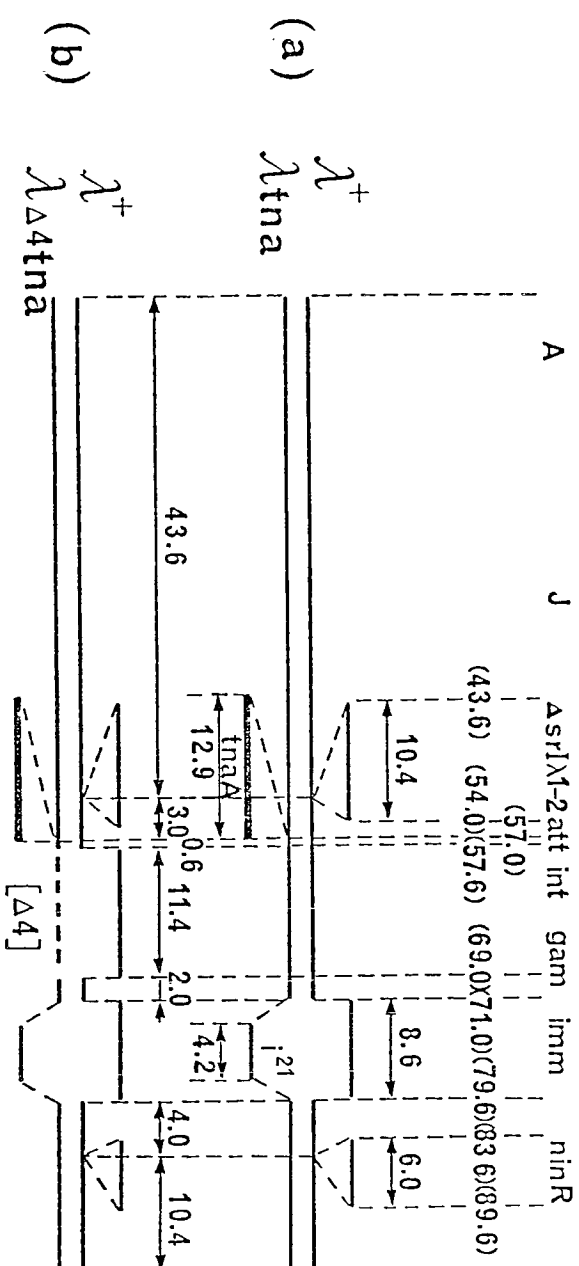
ある。dnaA遺伝子の近くに、トリプトファン
の構造遺伝子であるtna遺伝子があり(Backmann et al., 1976)、tna遺伝子を運ぶ形質導入
ファージ λ tna を作るに単離されたもの (Borck et al., 1976)。 λ tna を出発材料として、dnaA 遺伝
子付近の DNA を運ぶ形質導入ファージを単離し
た。形質導入活性と DNA 構造の比較から、tna、
recF、dnaA 遺伝子の存在する領域を決定し、
その領域から合成される蛋白質として、
各遺伝子産物を同定した。

第一章. dnaA形質導入フーズの単離と. λ
 の DNA 上での tnaA. dnaA 及び recF
 遺伝子部位の同定.

(i) dnaA 形質導入フーズの単離.

dnaA 形質導入フーズの単離に用いたフーズ
 λ tna は. Borck et al. によって単離された (1976).
 これは. 制限酵素 Hind III による切断
 部位が一つ所であるゲノムを持つフーズ
 no. 540 (λ srI λ 1-2 shr3⁺ att⁺ int⁺ imm² ninR shn6⁺,
 Murray and Murray, 1975) をベクターにして.
 大腸菌 DNA のコロニーニックを行なう. 実際には.
 tnaA 遺伝子を含む Hind III 断片が挿入された
 ものである. その DNA 構造を. λ DNA とのヘ
 テロ二重鎖マッピングによって調べると (図1a).
 tnaA 遺伝子を含む 12.9% λ ユニット (以下単位%
 と記す) の大腸菌 DNA が挿入されている. この
 大腸菌 DNA 部分と大腸菌染色体上の相同な部
 位との間の. recA 依存性の組み換えにより.

図1 (a) λ^+/λ_{tna} 及び (b) $\lambda^+/\lambda_{\Delta 4tna}$ のハテロ二重鎖構造.

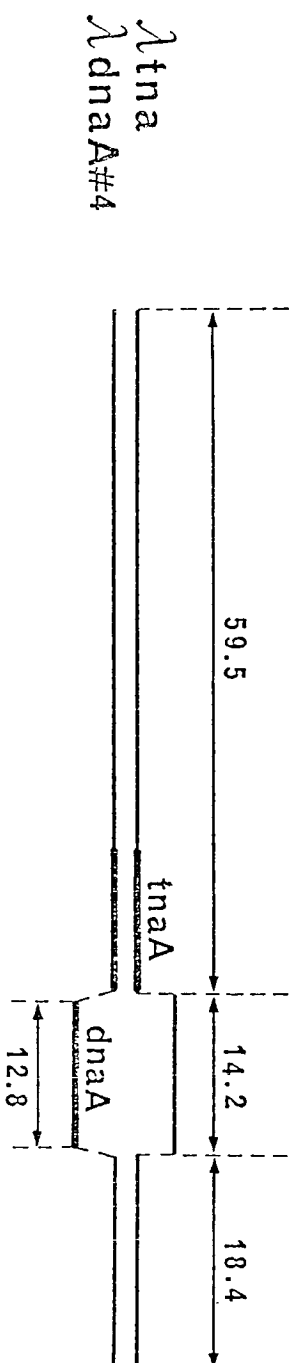


糸組ハ糸組ハ λ DNA E. 太ハ糸組ハ大腸菌 DNA E. ケハ7 断糸組ハ欠失部カ
E 表カス. 各セグメントハ長サハ λ % unit デ示シテハス. () 内ハ数字
ハ λ セグメント上ハ位置デアリ. 一番上ハ遺伝子 或リハ断部位ハ Davidson
and Szymbalski (1971) ニオッテ対応付けシテモデカス.

λ tna DNA が染色体 DNA 上に組み込まれてい
る溶原菌をつくることかできる。このように
して得た溶原菌の誘発溶菌液から、dna A 遺伝
子を含む形質導入する一組の単離を試みた。

λ tna は図 1(a) で示さうとしているように、宿主
DNA への付着部位 att と int 遺伝子を持、
いるために、通常の条件下では宿主 DNA の att
の部位で溶原化する。これを抑え、tna A 部位
での組み込みを行なわせるために、二通りの
方法を用いた。第一は、int 依存性の組み込
みの過程が温度感受性であるので (Guarneros
and Echols, 1973)、高温下 (43°C) で溶原化させ
ることである。このような条件下で得られた
溶原菌 594 (λ tna) の UV 照射による誘発溶菌
液から、dna A^{ts} 株、LC343 (dna A 46) と TR にす
る活性をもつ dna A 形質導入する一組が数株単離さ
れた。その中の一株、 λ dna A #4 (浮游密度
 1.494 g/cm^3) と以下の解析に用いた。 λ tna DNA
と λ dna A #4 DNA とのヘテロ二重鎖は、図 2 に
示さうとしているが、 λ dna A #4 は 14.2% の λ DNA

図 2. $\lambda tna/\lambda dnaA\#4$ の 入子口二重鎖構造

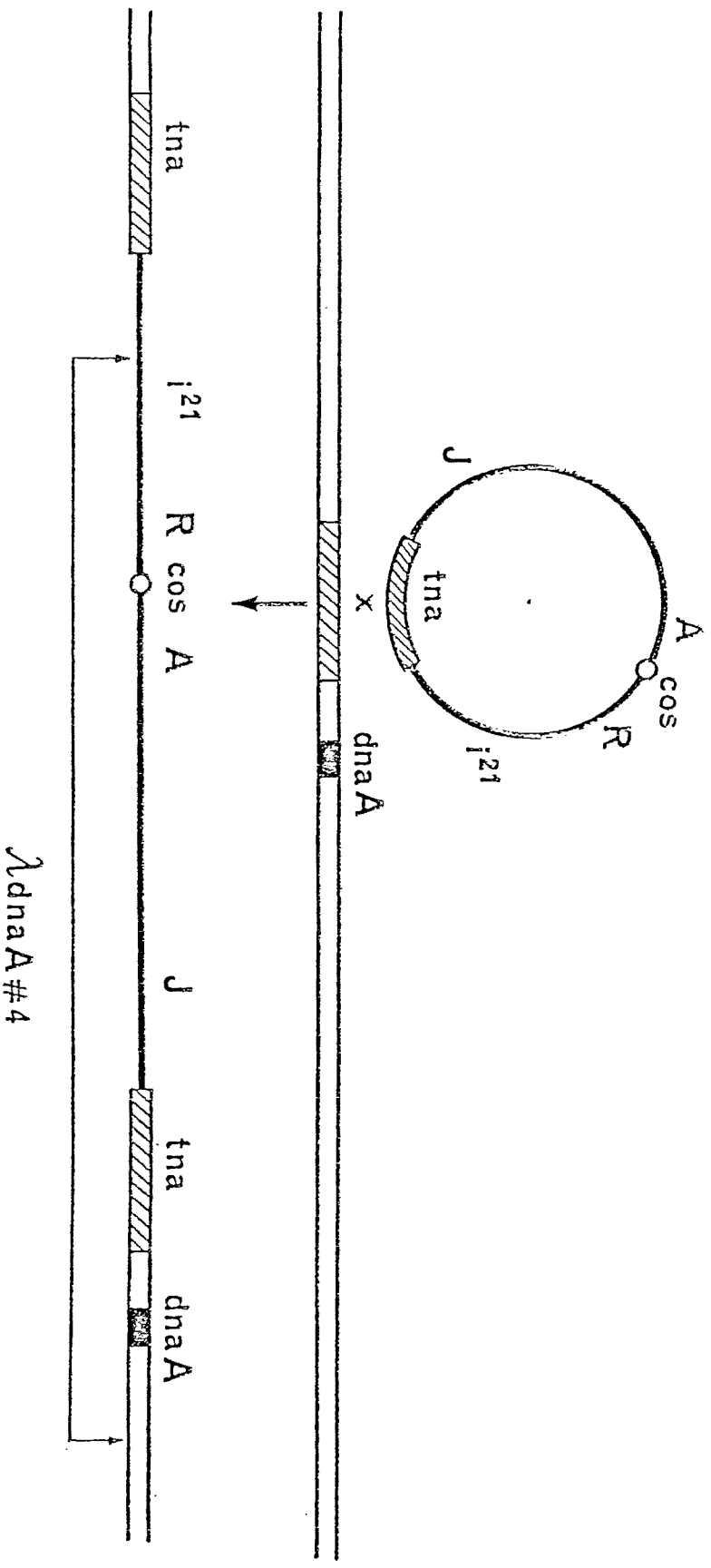


説明は図1と同じ。

と失ない、新たに dnaA 遺伝子を含む 12.8 % の大腸菌 DNA を得ている。図 3 は $\lambda \text{dnaA}\#4$ が生じたと思われる組み込みと切り出しの過程を模式図で示している。

int 依存性の組み込みを抑えるための方法は、 λtna から att-int 部位の欠失変異株を単離し、それを溶原化させることである。UV 照射は欠失変異の頻度を上げることが知られている (Schwartz and Beckwith, 1969)。 λtna の溶菌液を UV 照射 ($4,000 \text{ erg/mm}^2$, 生存率 $\times 10^4$) した後、 55°C 、30 分間の熱処理 (条件は Yamagishi and Ozeki, 1972 に拠る) を加えて、生き残り、 int 熱抵抗性の λ フォーミクス W3110 (P2) に感染・増殖させる。P2 溶原菌を増殖し得る λ フォーミクス (Spi フォーミクスは、 red 、 gam 遺伝子に欠損があること) が知られているので、この場合、W3110 (P2) で増殖するものの中には、 gam 遺伝子から int 遺伝子にも至る欠失変異株も含まれると予想される。実際に単離した Spi フォーミクスと Int-アッセイで調べると、その殆んどが int 依存

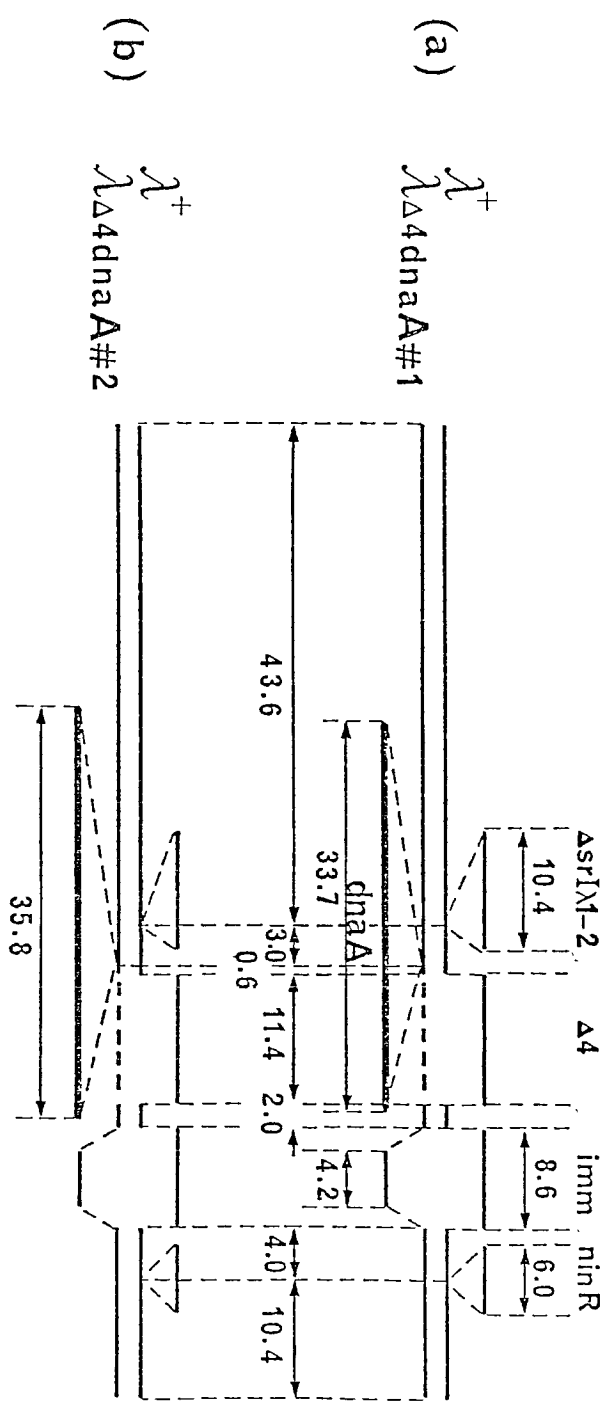
図3 λ dnaA#4 が生じたと思われる組み込みと切り出しの過程の模式図



一本種は λ DNA である。二本種は大腸菌 DNA を表す。斜線部分は tna 遺伝子領域を黒く塗りつけた部分は dnaA 遺伝子領域を示す。

性の組み込み能を失ったものであった。このようにして得た $Sp^+ Int^-$ フォーシ $\lambda\Delta tna$ (1.477 g/cm^3) の DNA 構造を調べると (図 1. (b)), att 部位から imm 領域側に 11.4 % の欠失が起こっており、Davidson and Szybalski (1971) のマップにより、この中には int, *red* 及び *gam* 遺伝子が含まれる。 $\lambda\Delta tna$ DNA が *recA* 依存性の組み換えにより、*tnaA* 部位に組み込まれている溶原菌 C600S ($\lambda\Delta tna$) の誘発溶菌液から、*dnaA* 形質導入フォーシ $\lambda\Delta dnaA \#1$ (1.509 g/cm^3), $\lambda\Delta dnaA \#2$ (1.514 g/cm^3) が単離された。これらのフォーシの DNA 構造を調べると (図 4 及び図 5), $\lambda dnaA \#4$ の場合と異なっており、 λ DNA は全く失われており、新たに、 $\#1$ では 20.8 % ($33.7 - 12.9$), $\#2$ では 22.9 % ($35.8 - 12.9$) の大腸菌 DNA を取り込んでいた。またこれらのフォーシは、共に増殖の過程で、非常に高頻度に *dnaA* 形質導入活性を失っており、 $\lambda\Delta tna$ と同じ浮遊密度 (1.477 g/cm^3) を示すフォーシを産生する。この二点の事は、 $\lambda\Delta tna$ DNA の組み

図4 (a) $\lambda^+ / \lambda_{\Delta 4 d n a A \# 1}$ $\Delta 4$ (b) $\lambda^+ / \lambda_{\Delta 4 d n a A \# 2}$ \wedge 下口二重鍍構造



説明は図1と同し

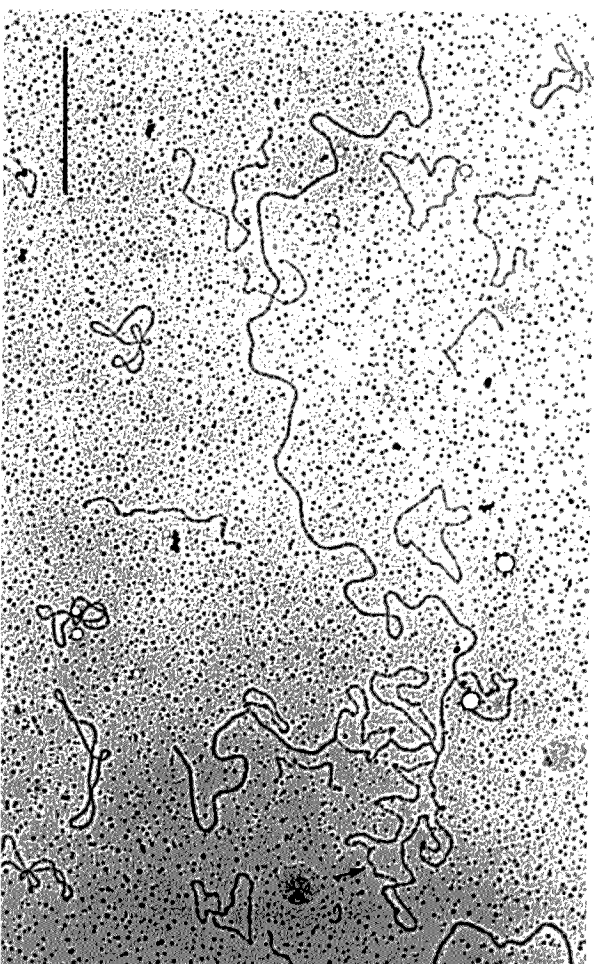


図5. λ^+ / λ dda dna A #1 ヲテロニ重鎖DNAの電子顕微鏡写真.

左EPは dna A遺伝子を含む大腸菌DNA部分を示す。

環状DNAは、長さ測定に用いた f dRF と f dSSDNA
である。左Fのバーは $1\mu m$ を表す。

込みと切り出しが図6のような過程を経て考えると説明がつく。このような切り出しがなされた場合、大腸菌DNAの両端には同じ *tnaA* 部分が存在することになる。増殖の過程では、相同部分間の組み換えが起こり、間に存在する *dnaA* 遺伝子を含む大腸菌DNAが欠落し、結果として、 $\lambda\Delta tna$ と同じブーッが生ずることになる。図7は $\lambda\Delta dnaA\#1$ と $\lambda\Delta dnaA\#2$ と $\lambda\Delta tna$ とのヘテロ二重鎖の構造を、DNAの長さには標準偏差値と付して示している。この組み合わせでは、長い二本鎖DNAの中間から新しく持ち込んだ大腸菌DNAの一本鎖のループが出ていゝ像が見られる。通常、この条件下でのDNAの長さの測定においては、標準偏差値[S.D.]と測定値の平均の平方根 $[\sqrt{L}]$ との比 $[S.D./\sqrt{L}]$ は、二本鎖、或いは一本鎖について、それぞれ一定値をとることか知られている (Davis et al., 1971; Yamagishi et al., 1976a)。図7において、二本鎖DNA全体の長さ (81.6 ± 2.3 或いは 80.8 ± 3.0) は

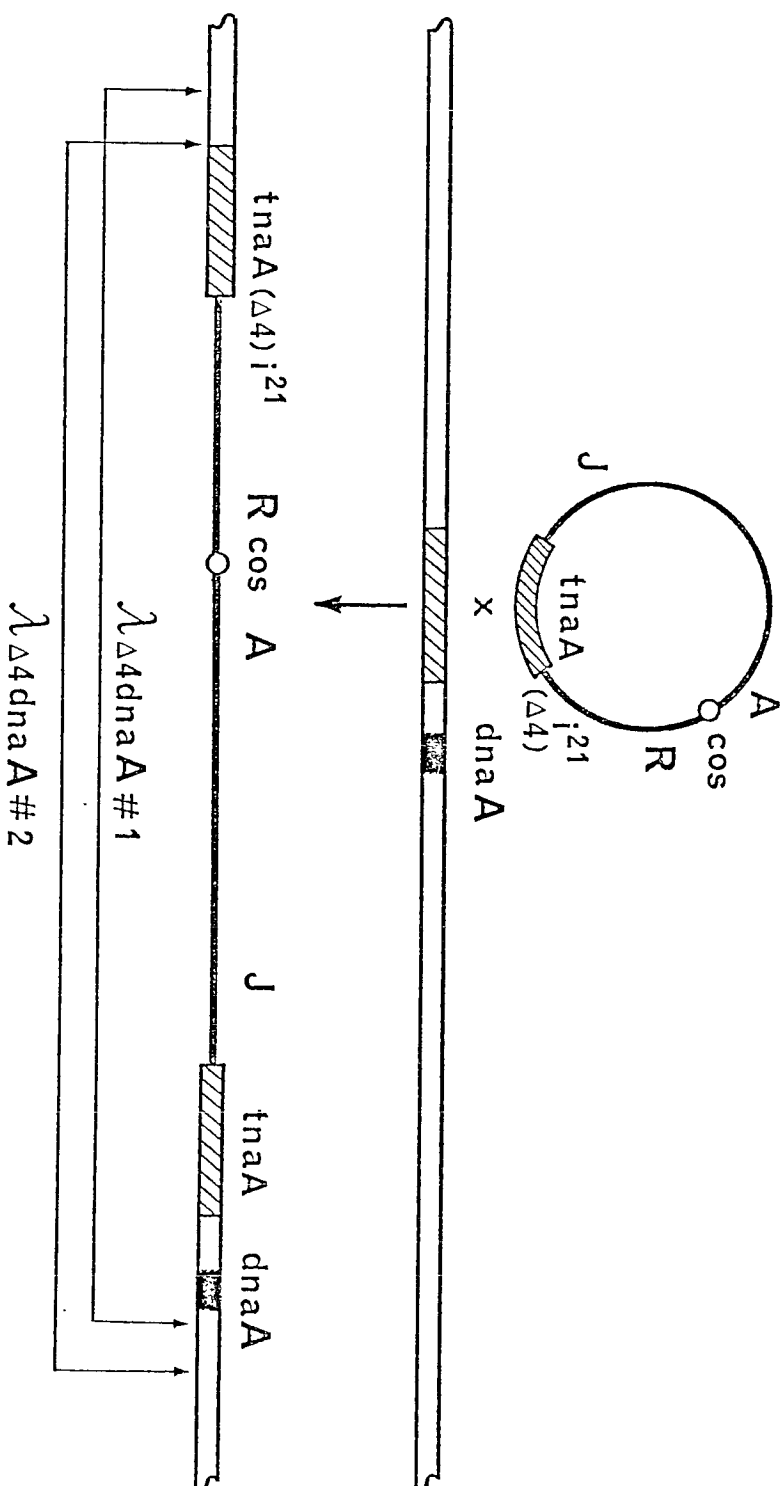
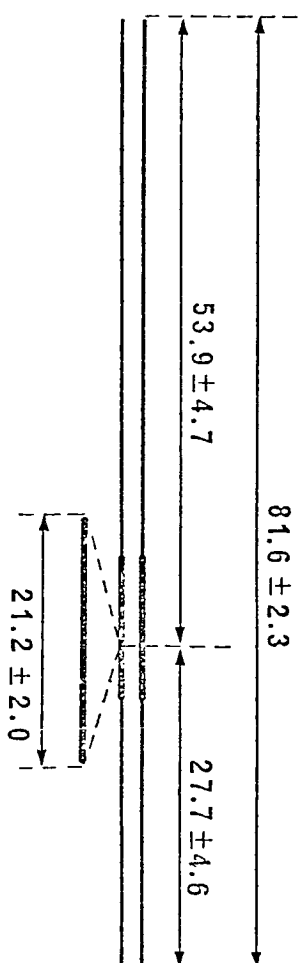


図6 λΔ4dnaA #1 或いは λΔ4dnaA #2 が生じたと思われる組み込みと切り出しの過程の模式図.

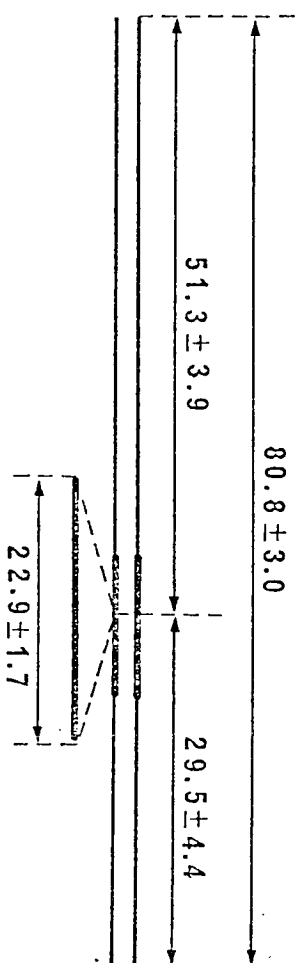
説明は図3と同じ。

図7 (a) $\lambda_{\Delta 4tna} / \lambda_{\Delta 4dnaA\#1}$ と (b) $\lambda_{\Delta 4tna} / \lambda_{\Delta 4dnaA\#2}$ のゲノム重複構造

(a) $\lambda_{\Delta 4tna}$
 $\lambda_{\Delta 4dnaA\#1}$



(b) $\lambda_{\Delta 4tna}$
 $\lambda_{\Delta 4dnaA\#2}$

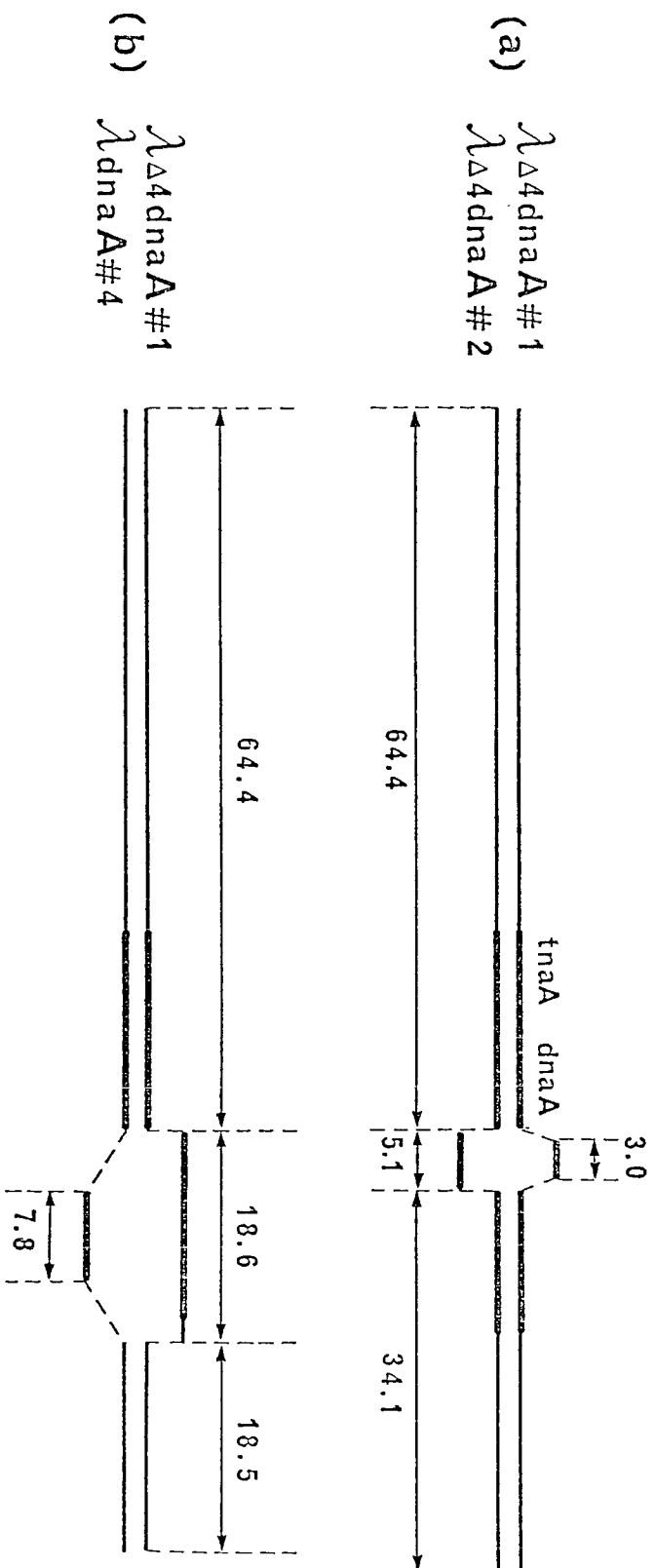


標準偏差値を付して示すこと以外は図1と同様。

適正な値であらうけれども、両端からループまでの長さ (53.9 ± 4.7 , 27.7 ± 4.6 或いは 51.3 ± 3.9 , 29.5 ± 4.4) は明きらかに大きな [σ 値] 値を示す。このことはループの位置が一点に定まっていることを予想させる。このループの位置の可変性もまた、先に述べた、 $\lambda\Delta 4dnaA\#1$ 及び $\#2$ では、大腸菌 DNA 部分の両端に、相同な *tnaA* 部分が存在しているという解釈と一致する。即ち、 $\lambda\Delta 4tna$ 上の *tnaA* 部分が、相手のニヶ所に在る *tnaA* 部分のどの部位と二本鎖を形成するかによって、*tnaA* 部分上の様々な位置にループの付着した分子が観察される筈だからである。

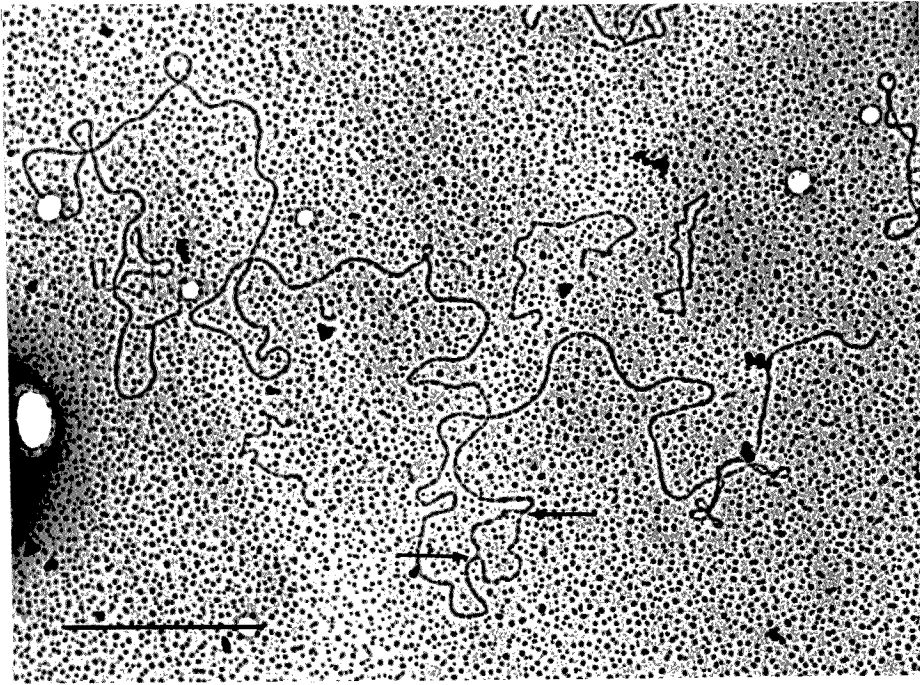
上記のようにして得た *dnaA* 形質導入率について、これらの値が大腸菌 DNA 間の関連性を決定するため、お互いの間のヘテロ二重鎖を観察した (図 8, 図 9)。 $\lambda\Delta 4dnaA\#1$ / $\lambda\Delta 4dnaA\#2$ (図 8, a) において、左端から 69.4% の相同な DNA のうち、 $\lambda\Delta 4tna$ に存在した部分は、59.5% (図 1 から算出: $43.6 + 3.0 + 12.9$)

図8 (a) $\lambda_{\Delta 4 dnaA \#1} / \lambda_{\Delta 4 dnaA \#2}$. $\lambda_{\Delta 4 dnaA \#1} / \lambda_{dnaA \#4}$ への二重鎖の構造.



説明は図1と図15。

(a)



(b)

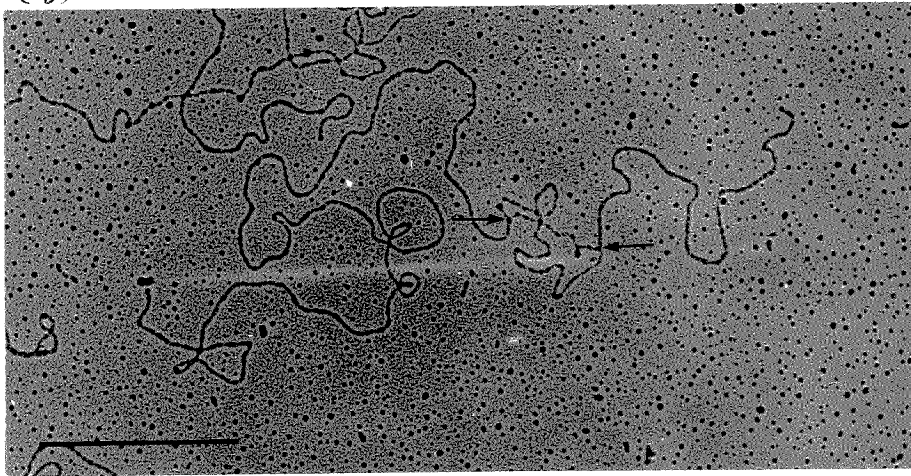


図 9 (a) $\lambda\Delta dnaA\#1/\lambda\Delta dnaA\#2$. 及び (b) $\lambda\Delta dnaA\#1/\lambda dnaA\#4$
ヘテロ二重鎖 DNA の電子顕微鏡写真

矢印は非相同部分の両端を示す。他は図5と同じ。

であるので、差し引き 4.9% が、それぞれが新しく得た DNA の中で、同じ塩基配列を持つものと考えられる。次の相補性を示さない部分は、図 6 で示されているように、#1 と #2 では切り出しの位置がずれていることによるもの、更に続く同一塩基配列を持つ大腸菌 DNA は右端に存在する *tna A* 部分であると考える。 λ dna A #1 / λ dna A #4 (図 8. b) では、やはり左端から 64.4% の相同塩基配列が存在することから、この両者においても新しく得た DNA のうち、共通な部分は *tna A* 部分に続く 4.9% のみであることがわかる。以上のことから、3 株の *dna A* 形質導入フラグに共通に持ち込まれている部分は、*tna A* 部分に続く 4.9% (2,400 塩基対) DNA であり、また、 λ dna A #1 DNA 上では 4.9% 部分に続く 3.0% 部分は *tna A* 遺伝子に対して、*dna A* 遺伝子と反対側の DNA であると考える。

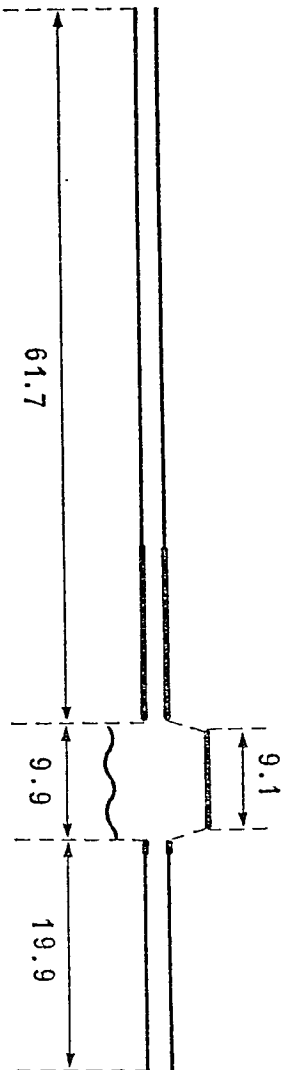
(ii) dnaA^- 欠失変異株の単離.

dnaA 形質導入する λ の DNA 上で、 dnaA 遺伝子の部位を決めるために、 dnaA^- 欠失変異株を単離することと試みた。この目的のために、アンピシリン耐性遺伝子を運ぶトランスポゾン Tn3 を用いた。 Tn3 の存在は高頻度に欠失変異を誘発することが報告されている (Nisen et al., 1977)。 $\lambda \text{dnaA}\#4$ と Tn3 を運ぶ ϕ ラスミット RSF2124 を持つ菌 C600/RSF2124 を増殖させた後、 dnaA^{ts} 株 (LC343 str BFR) に感染させる。感染菌の中で、アンピシリン耐性を獲得した菌について、 ts 性を調べる。このような操作で、アンピシリン耐性で、かつ ts 性を保持している菌の中には、 Tn3 を持ち込み、かつ、 dnaA 遺伝子に欠損がある $\lambda \text{dnaA}\#4$ の変異株が溶原化しているものも含まれると予想される。上記のようにして得た菌株の誘発溶菌液から、 $\lambda \text{dnaA}\#4\text{-Ap12}$ (1.4945 g/cm^3)、 $\lambda \text{dnaA}\#4\text{-Ap52}$ (1.492 g/cm^3) を単離した。この両者と

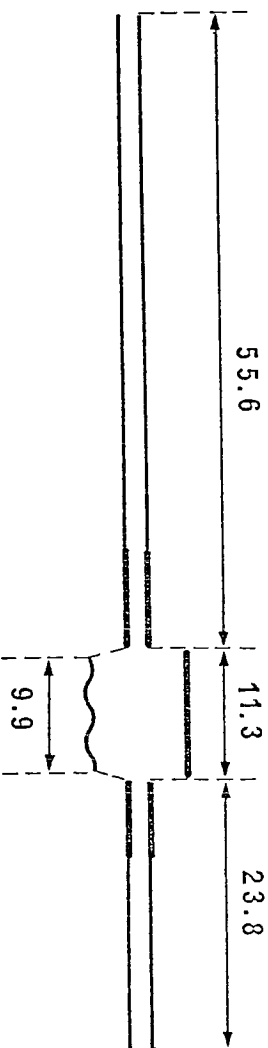
図 10 (a) $\lambda_{dnaA\#4} / \lambda_{dnaA\#4-Ap12}$, (b) $\lambda_{dnaA\#4} / \lambda_{dnaA\#4-Ap52}$, 及び

(c) $\lambda_{dnaA\#4-Ap12} / \lambda_{dnaA\#4-Ap52}$ のゲノムマップの構造。

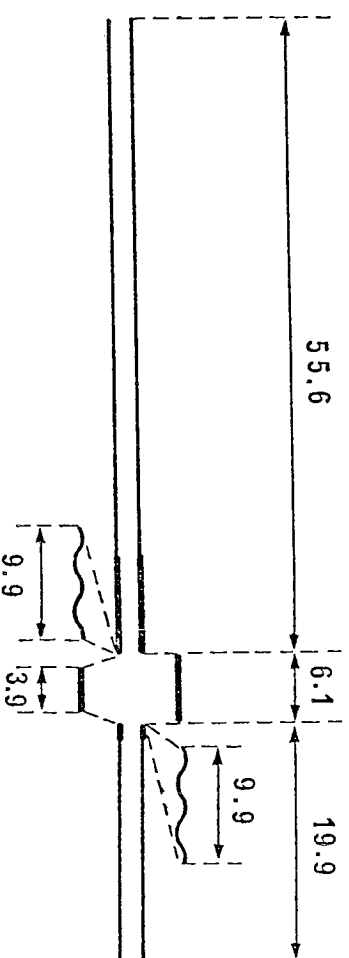
(a) $\lambda_{dnaA\#4}$
 $\lambda_{dnaA\#4-Ap12}$



(b) $\lambda_{dnaA\#4}$
 $\lambda_{dnaA\#4-Ap52}$



(c) $\lambda_{dnaA\#4-Ap12}$
 $\lambda_{dnaA\#4-Ap52}$



これらの線は Tm3-トランスポザンを表す。他は図1と同様。

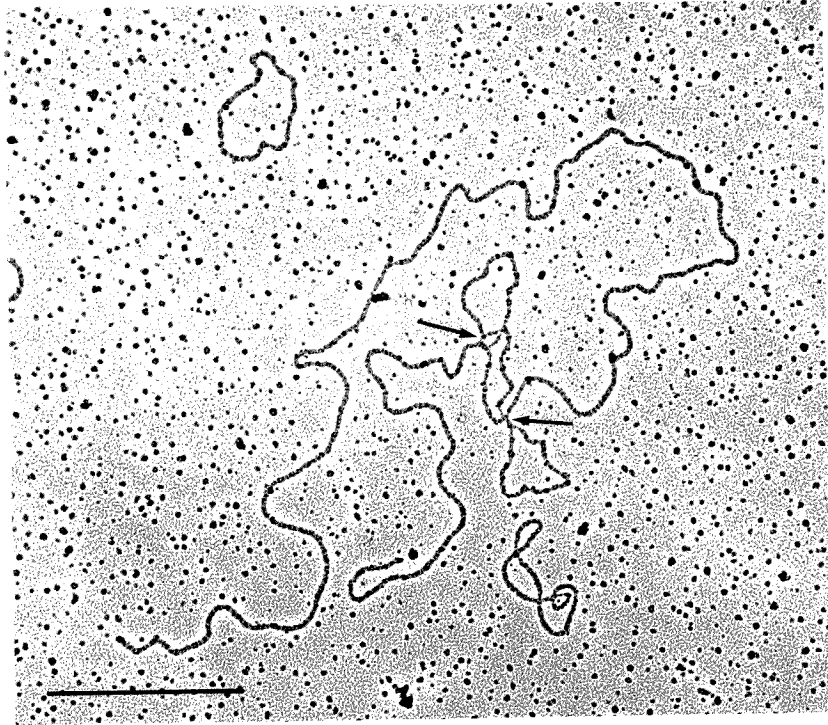


図11 λ dnaA#4-Ap12 / λ dnaA#4-Ap52 \wedge Tn3 二重鎖
DNA の電子顕微鏡写真.

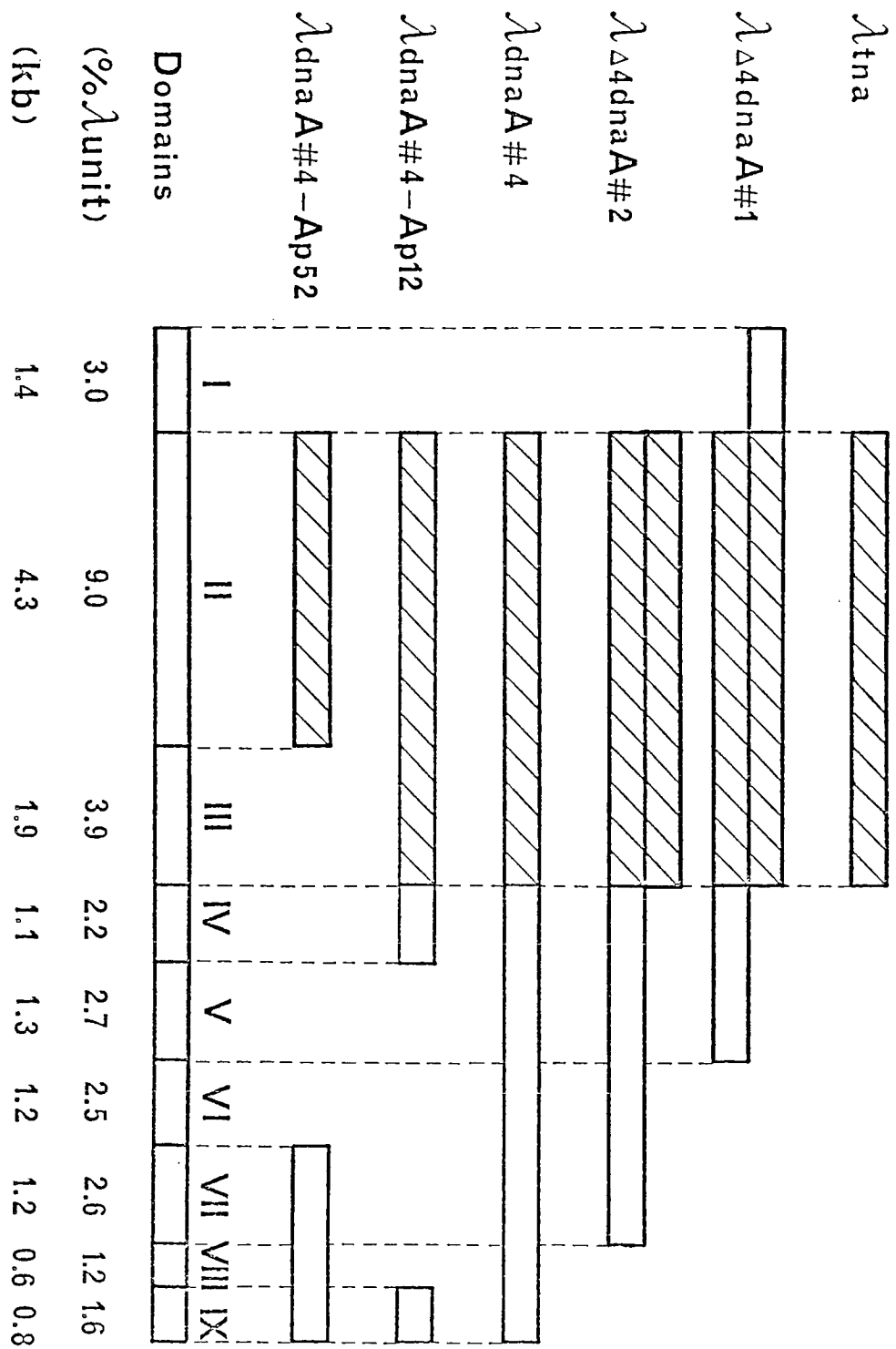
矢印は、非相同部分の両端を同時に Tn3 の
挿入部を示す。他は図5と同じ。

λ dna A#4 DNA とのヘテロ二重鎖 (図 10) とは
 両者の間のヘテロ二重鎖 (図 10. 11) と解析す
 ると、9.9% の Tn3 DNA を得た代わりに、
 λ dna A#4-Ap12 では、Tn3 の挿入部に隣接する
 9.1% の大腸菌 DNA が、 λ dna A#4-Ap52 では
 11.3% の大腸菌 DNA が、それぞれ欠失していた。
 λ dna A#4-Ap12 と -Ap52 とで共通に欠失してい
 る部分に dna A 遺伝子が在ったと考えられる。

(iii) tnaA, dnaA, recF 遺伝子の形質導入マーカー
 DNA 上でのマッピング。

前節までに、7 株の dnaA 遺伝子近傍の DNA
 を含む形質導入マーカーの DNA 構造と、種々の
 組み合わせのヘテロ二重鎖の解析から決定し
 た。それらのマーカーを含む大腸菌 DNA 部分と
 比較すると、図 12 のようになる。全体で、28.7
 % ユニット、或るいは、13,800 塩基対の DNA を

図12 種々の形質導入マーカーによって選ばれる大腸菌 DNA 部分の比較



資料系統別には出発材料のλtnaによって選ばれた部分を示す。

9>の領域に分けることができる。tnaA遺伝子、dnaA遺伝子。そして、これらの近くにあることかしろいいるrecF遺伝子が、どの領域に存在するかを決めるために、それぞれのもろーじの形質導入活性を調べた(表1)。表1において、tnaA、dnaA及びrecFの形質導入活性は、それぞれ、領域II、V及びVIの存在と挙動と共にする。即ち、tnaA、dnaAそしてrecF遺伝子の形質導入には、それぞれ、領域II、V、VIが必須である。従って、tnaA遺伝子は4300塩基対の領域IIに、dnaA遺伝子は1300塩基対の領域Vに、そしてrecF遺伝子は120塩基対の領域VIに、少なくとも遺伝子の一部は存在していると考えられる。

表1. 各形質導入マージンの形質導入活性と形質導入断片の構成

Transducing phage	Transducing activity ^a			Domains carried by phage ^b								
	<u>tnaA</u>	<u>dnaA</u>	<u>recF</u>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
<u>λtna</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>λdnaA</u> #4-Ap52	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<u>λdnaA</u> #4-Ap12	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<u>λΔ4dnaA</u> #1	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>λΔ4dnaA</u> #2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<u>λdnaA</u> #4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

^a +, positive; -, negative.^b +, presence; -, absence.

第2章. dnaA 遺伝子近傍の DNA から合成される蛋白質の同定

(1) tnaA, recF 遺伝子産物の候補蛋白質の検出.

形質導入フーズ DNA の構造解析と形質導入活性との比較から、tnaA, dnaA 及び recF 遺伝子の存在する領域が決定されたので、これらの領域から特異的に合成される蛋白質として、各遺伝子の遺伝子産物の同定を試みた。紫外線感受性株 N3-1 (λ bs ind⁻) に多量の紫外線 ($6.6 \times 10^3 \text{ erg/cm}^2$) を照射し、宿主の蛋白質合成を抑え、かつ、プロフーズのつくまりポレッサーによって、入遺伝子による蛋白質合成を抑えた条件下で、各種の形質導入フーズを感染させ、フーズ DNA に組み込まれている大腸菌 DNA から特異的に合成される蛋白質を、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンで標識した。標識された蛋白質を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、オートラ

ツオグうつと撮った。図13は、 λ ー Δ 感染直後から、15分間標識したものである。カラム(6)は λ brc感染菌のものであり、この系では、リプレスサーによる阻害のため、形質導入 λ ー Δ 感染に比べて、標識効率が悪いが、標識量と他の系と揃えることにより、実際以上に、入遺伝子由来の蛋白質を浮きだたせている。カラム(6)で検出されるバンドと異なるバンドは、形質導入断片に由来するものであり、左側に示した(a)~(e)の5本のバンドが検出された。バンド(b)については、カラム(6)のほぼ同じ位置に、入蛋白質があるが、それよりやや上に位置すること、及びカラム(5)の λ dnaA Δ -Ap Δ 2感染菌では見られないことから、入蛋白質ではないと判定した。各形質導入 λ ー Δ とそれらの感染によって検出されるバンドとの対応をまとめたものが表である。tnaA遺伝子は全ての λ ー Δ に在るか、全ての λ ー Δ から合成される蛋白質は分子量48,000ダルトン(或いは、48kd)のバンド(c)のみであることから、こ

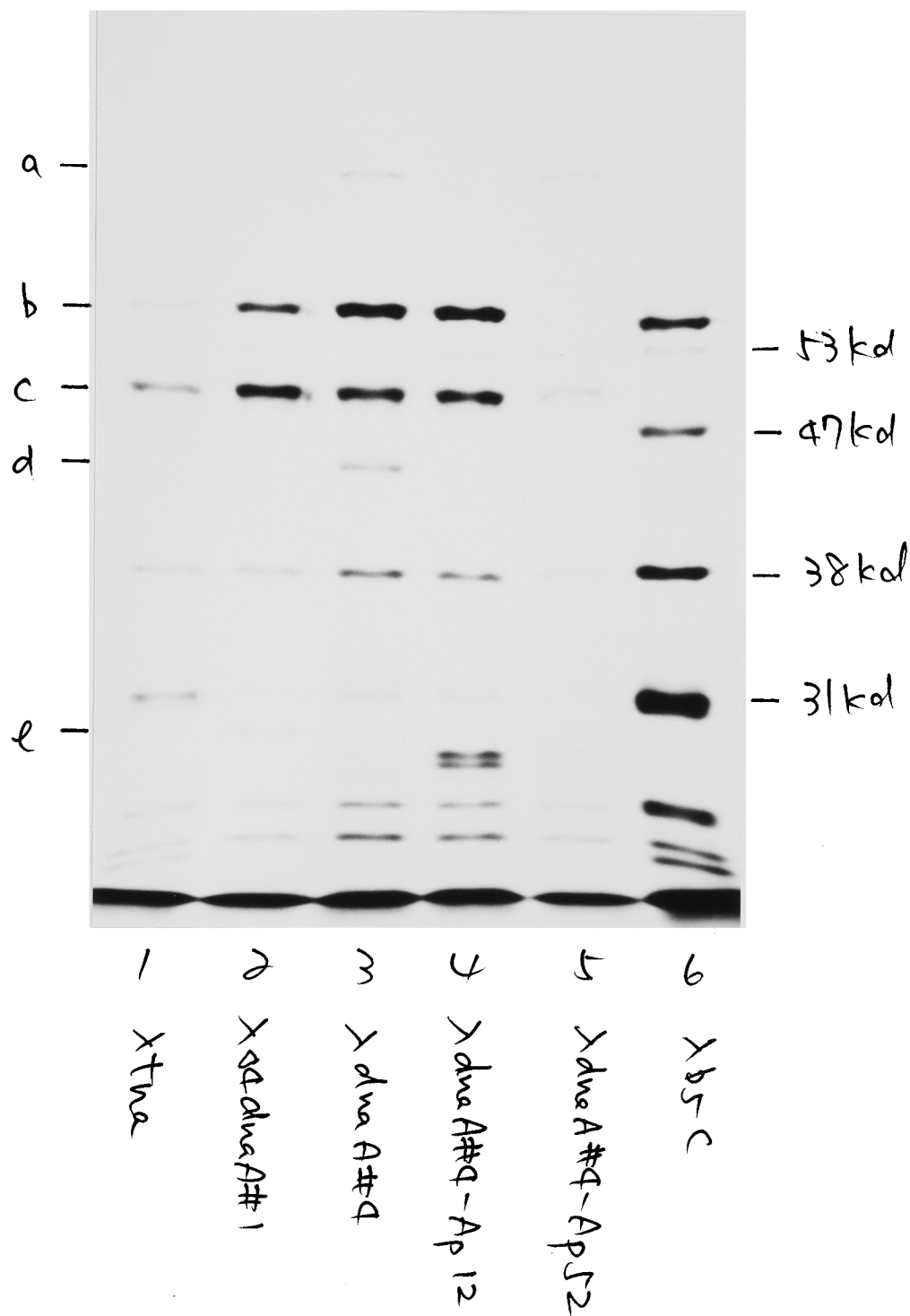


図13. 形質導入マーズ感染菌($dnaA^+$ 株)のSDS-
ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのおとらじオグラフ.

表 6 各種噬菌導入フーズが、菌の遺伝子とコードするタンパク質

Phage strain	Genetic marker ^a			Polypeptide ^a					
	<u>tnaA</u>	<u>dnaA</u>	<u>recF</u>	<u>e</u>	<u>c</u>	<u>b</u>	<u>d</u>	<u>a</u>	<u>a</u>
<u>λtna</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<u>λdnaA#4-Ap52</u>	+	-	-	-	+	-	-	+	+
<u>λdnaA#4-Ap12</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<u>λΔ4dnaA#1</u>	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<u>λdnaA#4</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+

^a +, detectable; -, undetectable.

図13の説明.

対数増殖期の N3-1 (λ b5 ind⁻¹) 細胞を集菌し、トリス-Mg バッファーに懸濁する (10^9 細胞/ml)。UV 照射 ($6,600 \text{ erg/mm}^2$) 後、各フラグと $\text{moi} = 20$ になるように加え、 37°C で 10 分間、吸着させる。吸着後、M9-M 培地で 2×10^8 細胞/ml に希釈し、同時に、 $[^{35}\text{S}]\text{-メチオニン}$ ($14 \mu\text{Ci/ml}$) を加え、 37°C で 15 分間、標識した。カル濃度は 12.5% である。右側の数字は、分子量の測定に用いた λ 蛋白質の分子量を表わす。

の蛋白質が、 tnaA 蛋白質の有力な候補である。また、 recF 遺伝子を持つ株は $\lambda\text{dnaA}\#4$ のみであり、 $\lambda\text{dnaA}\#4$ 感染菌のみで合成される蛋白質は、分子量 42 kd のバンド (d) であることから、これが recF 蛋白質の候補となる。しかし、 dnaA 遺伝子を持つ $\lambda\text{dnaA}\#4$ 及び $\lambda\text{dnaA}\#1$ の二株から、特異的に合成される蛋白質は検出できなかった。

(ii) *dnaA* 遺伝子産物の候補蛋白質の検出.

序章で述べたように、*dnaA* 遺伝子産物は DNA 複製の開始に特異的に関与していると考えられる。そうであるならば、その機能を果たすべき時に合成される蛋白質であるという可能性もあり得ると思われる。図13の実験条件は、形質導入断片上に存在する遺伝子の発現の制御機構は殆んど考慮していないものである。従って、確実に形質導入断片上の *dnaA* 遺伝子が発現している、即ち、遺伝子産物を合成している条件下で、*dnaA* 蛋白質を同定することが必要であると考えた。図14の実験はそのような条件を示すものである。低温で培養してきた *dnaA*^{ts} 株 LC343 [*dnaA*46] *str* *uvrA* (λ *bs* *ind*⁻) を高温での培養に移すと 1 時間以内に DNA 合成は停止する (▲)。DNA 合成が停止している菌に、やはり高温下で、*dnaA*⁺ 形質導入フーズ、 λ *dnaA* #4 (○)、 λ 44 *dnaA* #1 (△)、或は *dnaA*⁻ 形質導入フーズ、 λ *tna* (▽)、 λ *dnaA* #4-Ap 12 (□) を

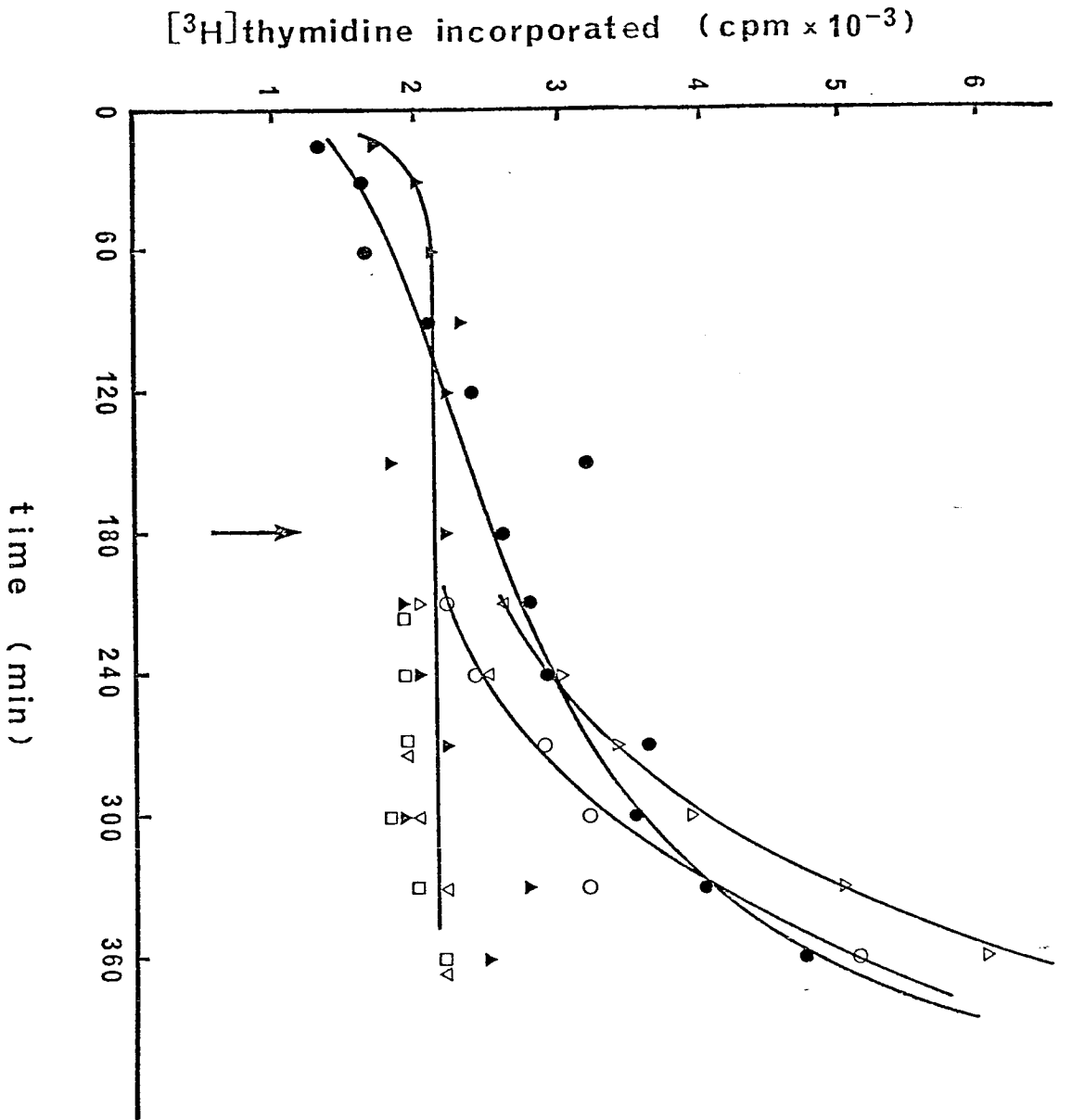


図14. 高塩下における形質導入マージン株後の *duaA46* 変異株 (LC343 str *uvrA* (Δ*bsi*ind⁻)) の DNA 合成

図14の説明.

LC343 str uvr A (λ b5 ind⁻) 細胞 E. 32°C M9-M 培地で培養する。細胞密度が 1.5×10^8 /ml の時に、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを加え (5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)、培養を二分する (time = 0)。一方は、32°C で培養を続け (●)、他方は、42°C に移す (▲)。180分後、(矢印が示している)、高温での培養に MgCl_2 を加え (10 mM)、各フーズを $\text{moi} = 20$ で感染させる。 $[^3\text{H}]$ -チミジンの TCA-不溶性分画への取り込みを、30分毎に測定する。感染に用いたフーズは、 λ tna (▽)、 λ dnaA#4 (○)、 λ 44 dnaA#1 (△)、717 λ dnaA#4-Ap12 (□) である。

感染し、DNA合成を調べると、 dnaA^+ の二株では、DNA合成が回復し、 dnaA^- の二株では回復が見られない。このことは、 dnaA^+ 株の感染では、形質導入断片上の dnaA 遺伝子から遺伝子産物が合成され、機能することによる。宿主の DNA 複製が再開したと解釈できる。このように形質導入断片上の dnaA 遺伝子から、遺伝子産物が合成されている状況の下で、蛋白質を標識し、解析したものが図15である。

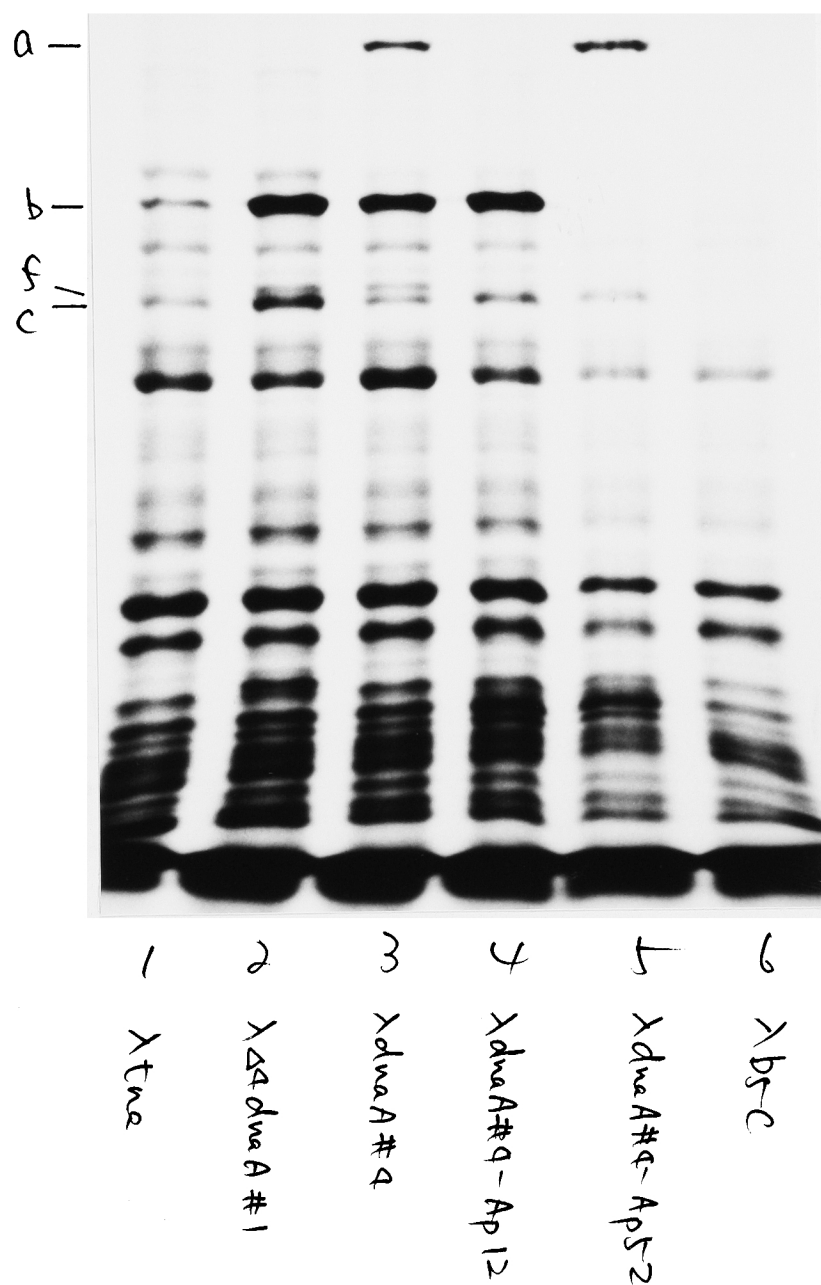


図15 形質導入フーズ感染菌 ($dnaA^{ts}$ 株) の SDS-
ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのおトラジオグラフ

図15の説明.

32°C. M9-M 培地で、対数増殖期にある LC343 str uvrA (λ b5 ind⁻) 細胞を 42°C に移し、培養を続ける。180 分後、やはり 42°C で UV 照射し、 $MgCl_2$ を加えた (10 mM) 後、 $moi = 20$ で各フーズを感染させる。同時に $[^{35}S]$ -メチオニンを加えて (10 μ Ci/ml)、15 分間標識した。ゲル濃度は 12.5% である。右側の \blacktriangle EP は、分子量マーカーの蛋白質の位置を示している。上から、bovine albumin (67 kD), bovine liver catalase (60 kD), bovine liver L-glutamic dehydrogenase (53 kD), hen albumin (45 kD), pepsin of hog stomach mucosa (35 kD), chymotrypsinogen A (25 kD) である。

LC343 str uvrA (λ b5 ind⁻) を高温下の培養に移し、3 時間後に、やはり高温下で紫外線を照射した後、形質導入フーズを感染し、同時に、 $[^{35}S]$ -メチオニンを加えて、合成される蛋白質を 15 分間標識した。図13と比べると、いっけいバックスグラウンドが非常に高いが、これは高温下で UV 照射及びフーズ感染を行なう目的で、集菌・フーズ吸着の操作を除いたこ

とにより、 λ — ϕ 感染が同調される、形質導入断片由来の蛋白質合成のレベルが下がったことに因るものと思われる。しかし、この系で、図13では検出されないが、 λ 新(リバント)(49kd)が検出された。しかも、このバンドは、 λ 84 dnaA#1 (カラム(2))、 λ dnaA#4 (カラム(3))の dnaA⁺株の感染菌にのみ見られる。従って、バンド(f)蛋白質が dnaA 蛋白質の候補となる。

(iii) tnaA, recF 及び dnaA 遺伝子産物の同定

前節までに近々13,800塩基対(13.8kb)の形質導入断片から合成される計6種類(a~f)の蛋白質を検出した。これらの6種類の蛋白質の分子量の総和は、295kdとなり、これらをコードする λ に必要なDNAは約8.9kbとなる。これは13.8kbの形質導入断片の64.5%を占めるにすぎず、未だ検出されていない蛋白質が存在することか予想される。条件をやや変えることによ

って新たに蛋白質の検出を試みた。図16は、図13の実験条件において、マーズ感染直後の15分間の標識に代えて、感染後15分から30分間標識したものである。図13に検出された(a)~(e)の5本のバンドに加えて、新たにバンド(g)(66kd)、(h)(50kd)が検出された。しかし、図14に検出されたバンド(f)はやはり検出されなかった。(A)のカラム(1)、*λ*tna感染菌には、(h)の位置にバンドがあるが、カラム(2)、(3)のバンドと比べると、やや上にずれているように思われることと、濃度が薄いことから、有無とすることも判定できなかった。各形質導入マーズと各蛋白質の対応は表3に示している。

図16の説明

実験条件は、標識の時期とゲル濃度以外は、図13と同じ。

標識は、マーズ感染後、15分から45分までの30分間行なった。ゲル

濃度は10%である。(A)右側の▲印は分子量マーカーの蛋白質の

位置を示す。上から、bovine albumin (67kd)、hen albumin

(45kd)、chymotrypsinogen A (25kd)である。

(A)

(B)

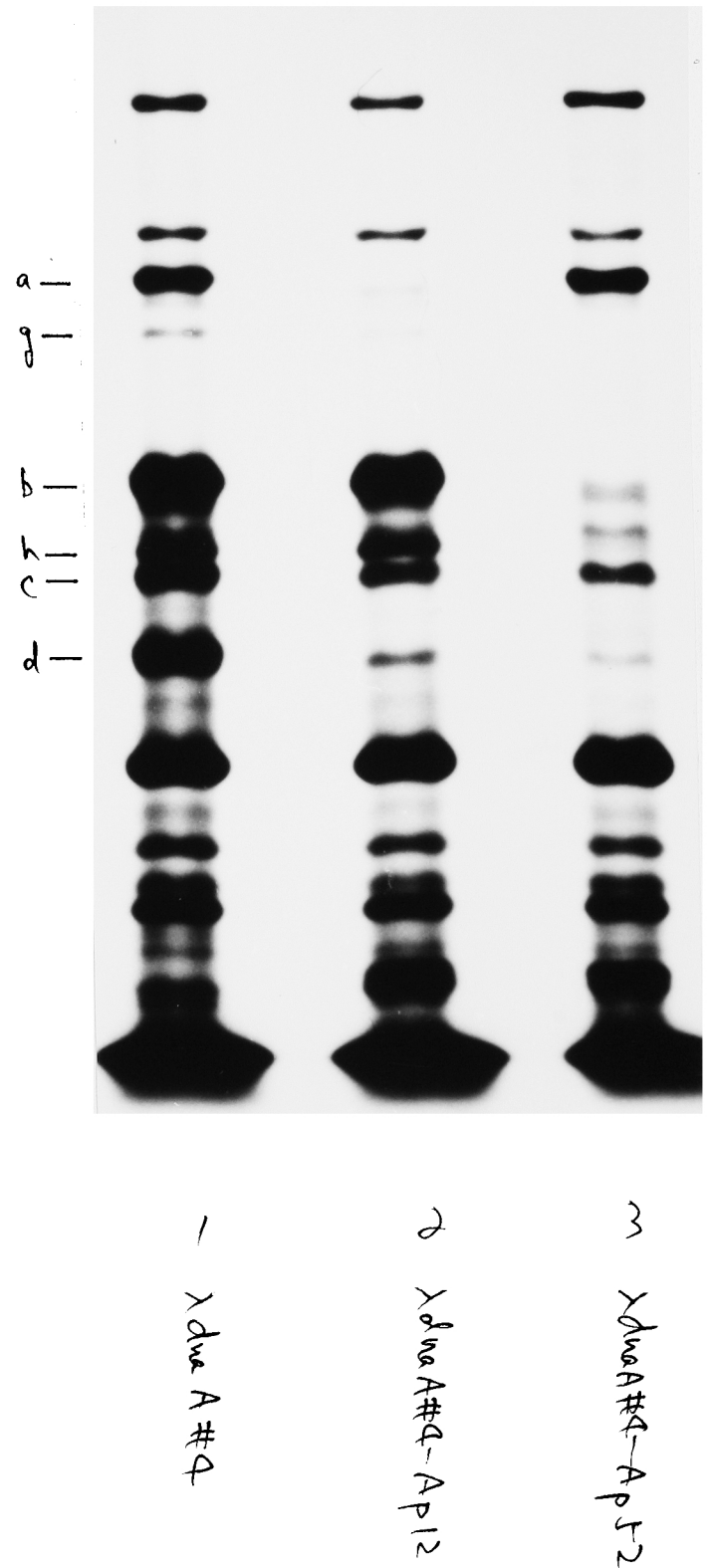
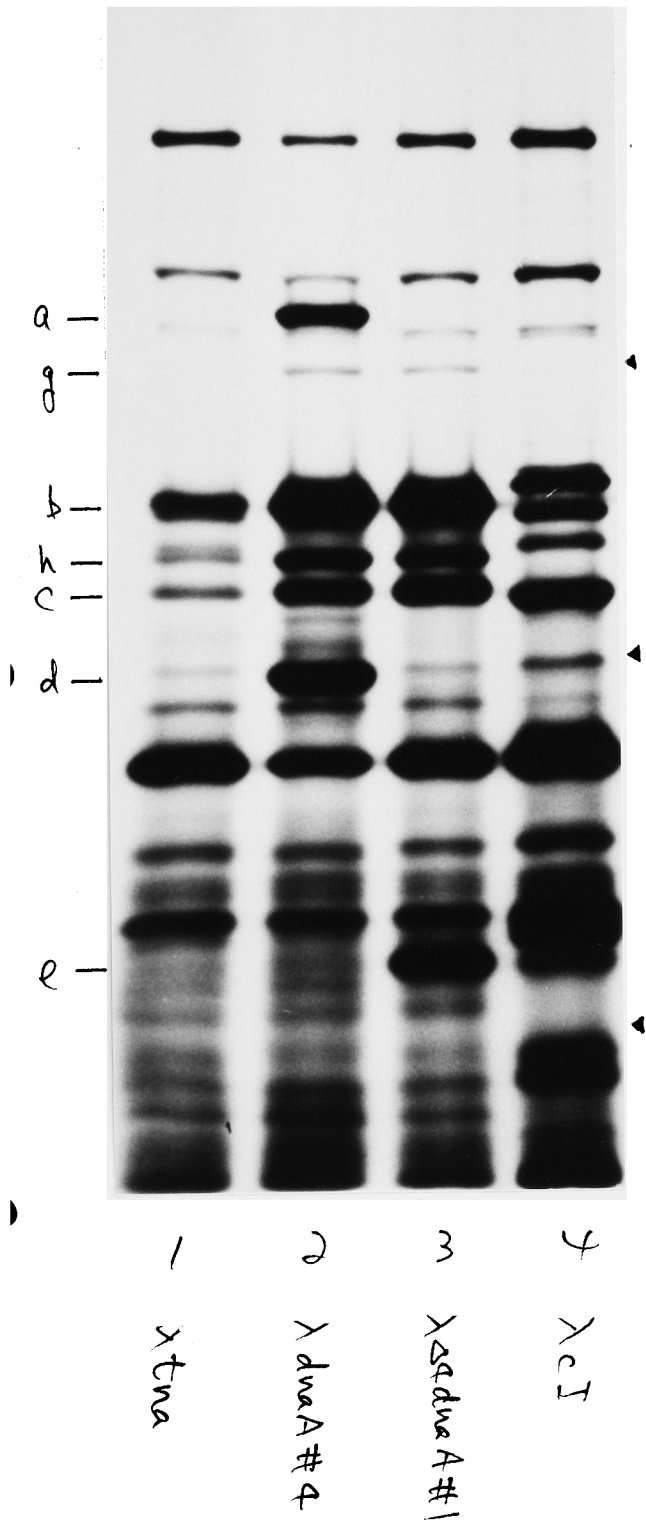


図16 形質導入ファージ感染菌 (dnaA^+ 株) の SDS-

ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのおとラジオグラフ

表3 各形質導入マージンの形質導入断片の構成とコードおよびオリゴヌクレオチド

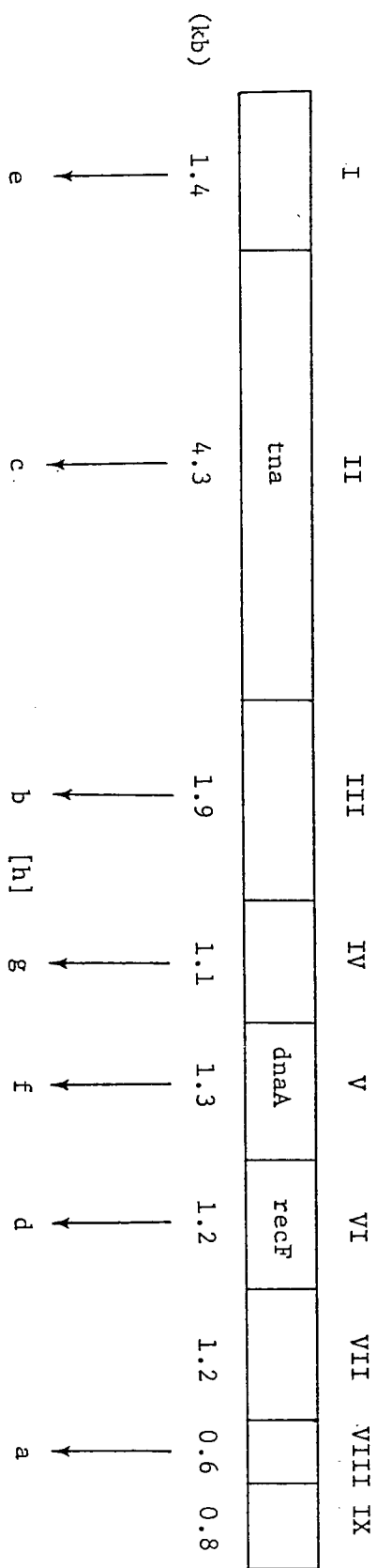
Phage strain	Domains ^a									Polypeptide ^b						
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	e	c	b	h	g	f	d
										28k	48k	56k	50k	66k	49k	42k
<u>λ</u> tna	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<u>λ</u> dnaA#4-Ap52	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<u>λ</u> dnaA#4-Ap12	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<u>λ</u> Δ4dnaA#1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<u>λ</u> dnaA#4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

^a +, presence; -, absence.

^b +, detectable; -, undetectable.

これまでの図13.15.16の実験で、バンド(a)~(h)の8種類の蛋白質が、形質導入断片由来のものとして検出された。蛋白質の分子量の総和は411kdとなり、これをコードするのに必要なDNAは12.3kbである。これは全形質導入DNA(13.8kb)の89.1%を占める。8種類の蛋白質をコードする各遺伝子の間の、少なくとも7箇所のスパーサ一部分を考慮すると、残りの10.9%(1.5kb)には、これ以上の遺伝子が存在する可能性は低いと思われる。

各形質導入フーヅから合成される蛋白質と、第1章で決定した各フーヅのDNA構造とを比較することによって(表を参照)、バンド(a)~(h)の各蛋白質が、第1章(iii)で設定した領域I~IXのどの部分から合成されるかを決めることができる。それを示したものが図17である。矢印を結んだ、領域と蛋白質の関係は、その蛋白質の合成には相手の領域が必須であり、と、即ち、その蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも一部は、相手の領域に存在するとい



うことを表わしている。第1章(iii)で、*tnaA*、*dnaA*及び*recF*遺伝子の少なくとも一部は領域II、V、VIにそれぞれ存在することが示された。図17にあり、*tnaA*遺伝子の存在する領域IIが、その合成に必須である蛋白質は、第2章(i)で*tnaA*遺伝子産物の候補蛋白質として検出されたバンド(c)蛋白質のみである。従って、*tnaA*遺伝子産物は分子量48kDaのバンド(c)蛋白質と同一である。同様に、*recF*遺伝子の存在する領域VIが、その合成に必須である蛋白質はバンド(d)蛋白質のみであることから、分子量42kDaのバンド(d)蛋白質が*recF*遺伝子産物と同一である。更に第2章(ii)で、*dnaA*遺伝子産物の候補蛋白質として検出された分子量49kDaのバンド(f)蛋白質が、*dnaA*遺伝子の存在する領域Vを必要とする唯一の蛋白質であることから、これが*dnaA*遺伝子産物であると同一である。

オ3章 考察

オ1章で、大腸菌の *dnaA* 遺伝子領域、近々 13.8 kb の DNA を運び形質導入ろっを単離し、その DNA 構造を決定した。オ2章では各形質導入ろっから合成される蛋白質を解析し、計8種類の蛋白質を検出した。*tnaA* 遺伝子産物として、バンド c (48kd)、*dnaA* 遺伝子産物として、バンド f (49kd)、*recF* 遺伝子産物として、バンド d (42kd)、そして、コードする遺伝子が明かされていない5種類の蛋白質、バンド a (70kd)、b (56kd)、e (28kd)、g (66kd)、h (50kd) である。この中で、バンド e とバンド a 蛋白質は端の領域(図17参照)から合成されることから、完全な分子ではないという可能性も考えられる。

Hansen and Meyenberg (1979) は *tna* 遺伝子を運び多数の形質導入ろっを単離し、54kd 蛋白質を *dnaA* 遺伝子産物と同定した。彼ら

の分子量の見積りは、総じて我々のものより大きい。54kd蛋白質に対応するものか、我々が *dnaA* 遺伝子産物と同定したバンド (49kd) 蛋白質であるか、隣の領域から合成されるバンド (50kd) 蛋白質であるかは不明である。

最近、Kimura et al (1980) によつて、*dnaA* 遺伝子の amber 変異株が単離され、その解析から、50kd 蛋白質が *dnaA* 遺伝子産物として同定された。また、Yuasa and Sakakibara (1980) は *dna167* 変異の導入によつて等電点の変化する蛋白質として、48kd 蛋白質と同定した。この両者とバンド (49kd) 蛋白質は同じものである。

序章でも触れたように、*dnaA* 遺伝子の近傍に、DNA複製に関与する遺伝子、*dnaN* がマッピングされた (Sakakibara and Mizukami, 1980)。この遺伝子産物として、43kd 蛋白質 (Kimura et al., 1979) あるいは、41kd 蛋白質 (Yuasa and Sakakibara, 1980) が同定された。*dnaA* 遺伝子に隣接する遺伝子の産物であること、その分子量の類

似性から考えると、我々が、*recF* 遺伝子産物
と同定したバンド d (42kd) 蛋白質と同じもの
かもしない。RecF 変異と DnaN 変異は、同一
遺伝子内の表現型の異なるものである可能性
がある。

recF 遺伝子の隣に位置する *gyrB* 遺伝子は
約 90 kd の DNA gyrase のサブユニット B 蛋白質を
コードする (Mizunuchi et al., 1978)。我々の検出し
た蛋白質の中には、この分子量に相当するもの
はない。しかし、バンド a (72kd) 蛋白質は、
recF 遺伝子の隣から合成され、しかも、先に
述べたように、不完全な分子であることも考
えられる。更に、中村 (大日本製薬株、私信) によ
ると、形質導入マーズ、 λ dnaA#4 と λ dnaA#4-Ap52
は *gyrB* 遺伝子内の変異の一つ、nalC^r (ナリジキ
ンニ酸抵抗性変異) に対し、形質導入活性を持
つ。即ち両マーズは少なくとも *gyrB* 遺伝子の
一部は含む。そして、この両マーズのみが、
バンド a 蛋白質を合成する。以上のことから、
バンド a 蛋白質は、分割された *gyrB* 遺伝子に

由来する DNA gyrase サブユニット B 蛋白質の N 端側断片に当たる可能性が強い。

序章を述べたように、dnaA 遺伝子の役割に関しては、多くの推定がありながらも、未だ明きらかではない。dnaA 遺伝子産物が同定されたことにより、そのような推定に対する検証の道が開けたものと考ええる。近い将来、dnaA 遺伝子産物の真の機能が解明されるであろう。また、dnaA 遺伝子領域に、DNA 複製に関与する遺伝子、dnaA、recF、gyrB として dnaN が一群を成していることが、遺伝学的に示された。そして、この領域の DNA 構造と、そこから合成される蛋白質の解析によっても、他の構造遺伝子と間に挟むことなく並んでいる可能性が強い。このように、DNA 複製という共通の機構に関与している遺伝子群が隣接していることは、それらが同一の制御系に属する可能性を考えさせる。そして、もしそうであるならば、この機構は、単離されたこの領域の DNA を用いて解析から明きらかにされる

子 子 子 子 子。

謝 辞

本研究は、京都大学・理学部・生物物理学教室、小関研究室の小関治男教授、山岸秀夫博士、井口ハ郎博士との討論のもとに行なわれたものです。有益な討論と展開して下さった三先生に深く感謝します。特に、山岸博士には、論文発表に際して、多くの厚意を受けました。重ねて深謝します。

志村令郎博士・池村淑道博士は、多くの助言と、研究の在り方についての示唆を与えてくださいました。ここに謝意を表します。また、共に、小関研究室に在籍し、研究に励んだ院生の方々との議論も大いに役立ちました。議論の相手をして下さった方々に感謝します。

References

- Abe, M., Tomizawa, J.: Chromosome replication in Escherichia coli K12 mutant affected in the process of DNA initiation. Genetics 69, 1-15 (1971)
- Appleyard, R.K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K12. Genetics 39, 440-452 (1954)
- Bachmann, B., Low, K.B., Taylor, A.: Recalibrated linkage map of Escherichia coli K12. Bacteriol. Rev. 40, 116-167 (1976)
- Bachmann, B.J., Low, K.B.: Linkage map of Escherichia coli K12, Edition 6. Microbiol. Rev. 44, 1-56 (1980)
- Bagdasarian, M.M., Izakowska, M., Bagdasarian, M.: Suppression of the DnaA phenotype by mutations in the rpoB cistron of ribonucleic acid polymerase in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J. Bacteriol. 130, 577-582 (1977)
- Bird, R., Louarn, J., Martuscelli, J., Caro, L.G.: Origin and sequence of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 70, 549-566 (1972)
- Bonner, W.M., Laskey, R.A.: A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46, 83-88 (1974)
- Borck, K., Beggs, J.D., Brammar, W.J., Hopkins, A.S., Murray, N.E.: The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda. Molec. gen. Genet. 146, 199-207 (1976)
- Carl, P.L.: Escherichia coli mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. Molec. gen. Genet. 109, 107-122 (1970)
- Davidson, N., Szybalski, W.: Physical and chemical characteristics of lambda DNA. In: The Bacteriophage Lambda (A.D.Hershey, ed.). pp.45-82 Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory (1971)
- Davis, R.W., Simon, M., Davidson, N.: Electron microscope heteroduplex methods for mapping of base sequence homology in nucleic acids. Methods in Enzymology 21, 413-428 (1971)
- Fianndt, M., Honigman, A., Rosenvold, E.C., Szybalski, W.: Precise measurement of the b2 deletion in coliphage lambda. Gene 2, 289-293 (1977)
- Ganesan, A.K., Seawell, P.C.: The effect of lexA and recF mutations on post-replication repair and DNA synthesis in Escherichia coli K12. Molec. gen. Genet. 141, 189-205 (1975)
- Gartner, T.K., Riley, M.: Isolation of mutants affecting tryptophanase production in Escherichia coli. J. Bacteriol. 89, 313-318 (1965)

- Guarneros, G.M Echols, H: Thermal asymmetry of site-specific recombination by bacteriophage lambda. *Virology* 52, 30-38 (1973)
- Hansen, F.G., Rasmussen, K.: Regulation of the dnaA product in Escherichia coli. *Molec. gen. Genet.* 155, 219-225 (1977)
- Hansen, F.G., Meyenberg, K.: Characterization of the dnaA, gyrB and other genes in the dnaA region of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages λ_{tna} . *Molec. gen. Genet.* 175, 135-144 (1979)
- Hirota, Y., Ryter, A., Jacob, F.: Thermosensitive mutants of E.coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 677-686 (1968)
- Hirota, Y., Mordoh, J., Jacob, F.: On the process of cellular division in Escherichia coli. III. Thermosensitive mutants of Escherichia coli altered in the process of DNA initiation. *J. Mol. Biol.* 55, 369-387 (1970)
- Horii, Z.I., Clark, A.J.: Genetic analysis of the RecF pathway of genetic recombination in Escherichia coli K12: isolation and characterization of mutants. *J. Mol. Biol.* 80, 327-344 (1973)
- Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F.: On the regulation of DNA replicaton of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329-348 (1963)
- Kato, T., Rothman, R.H., Clark, A.J.: Analysis of the role of recombination and repair in mutants of Escherichia coli by UV irradiation. *Genetics* 87, 1-18 (1977)
- Kellenberger-Gujer, G., Podhajska, A.J., Calo, L.: A cold sensitive dnaA mutant of E.coli which overinitiates chromosome replication at low temperature. *Molec. gen. Genet.* 162, 9-16 (1978)
- Kimura, M., Miki, T., Hiraga, S., Nagata, T., Yura, T.: Conditionally lethal amber mutations in the dnaA region of the Escherichia coli chromosome that affect chromosome replication. *J. Bacteriol.* 140, 825-847 (1979)
- Kimura, M., Yura, T., Nagata, T.: Isolation and characterization of dnaA amber mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 144, 649-655 (1980)
- Kohiyama, M., Cousin, D., Ryter, A., Jacob, F.: Mutants thermosensibles d'Escherichia coli K12. I. Isolement et caractérisation rapide. *Ann. Inst. Pasteur* 110, 465 (1966)
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

- Lark, K.G., Renger, H.: Initiation of DNA replication of Escherichia coli 15T⁻: Chronological dissection of three physiological processes required for initiation. J. Mol. Biol. 42, 221-235 (1969)
- Lark, K.G.: Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in Escherichia coli 15T⁻. J. Mol. Biol. 64, 47-60 (1972)
- Laskey, R.A., Mills, A.D.: Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335-341 (1975)
- Liedke-Kulke, M., Kaiser, A.D.: The c-region of coliphage 21. Virology 32, 475-481 (1967)
- Low, B.: Formation of merodiploids in matings with a class of Rec⁻ recipient strains of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 60, 160-167 (1968)
- Marsh, R.C., Worcel, A.: A DNA fragment containing origin of replication of the Escherichia coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2720-24 (1977)
- Meijer, M., Beck, E., Hansen, F.G., Bergmans, H.E.N., Messer, W., von Meyenberg, K., Schaller, H.: Nucleotide sequence of the origin of replication of the Escherichia coli K-12 chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 580-584 (1979)
- von Meyenberg, K., Hansen, F.G., Nielsen, L.D., Riise, E.: Origin of replication, oriC, of the E.coli chromosome on specialized transducing phages λ asn. Molec. gen. Genet. 160, 287-95 (1978)
- Miki, T., Hiraga, S., Nagata, T., Yura, T.: Bacteriophage λ carrying the Escherichia coli chromosomal region of the replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5099-5103 (1978)
- Miki, T., Kimura, M., Hiraga, S., Nagata, T., Yura, T.: Cloning and physical mapping of the dnaA region of the Escherichia coli chromosome. J. Bacteriol. 140, 817-824 (1979)
- Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Gellert, M.: DNA gyrase: Subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5960-63 (1978)
- Murialdo, H., Siminovitch, L.: The morphogenesis of bacteriophage lambda IV. Identification of gene products and control of the expression of the morphogenetic information. Virology 48, 785-823 (1972)
- Murray, K., Murray, N.E.: Phage lambda receptor chromosome for DNA fragments made with restriction endonuclease III of Haemophilus influenzae and restriction endonuclease I of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 98, 551-564 (1975)

- Nisen, P.D., Kopecko, D.J., Chou, J., Cohen, S.N.: Site-specific DNA deletions occurring adjacent to the termini of a transposable ampicillin resistance element (Tn3). *J. Mol. Biol.* 117, 975-998 (1977)
- Ohshima, Y., Ozeki, H., Amamura, M., Horiuchi, T.: Isolation and characterization of a plaque-forming lac-transducing phage $\phi 80_{\text{plac}}$ with special reference to its integration and excision. *Molec. gen. Genet.* 126, 303-317 (1973)
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Kainuma, R., Sugino, A., Iwatsuki, N.: In vivo mechanism of DNA chain growth. Cold Spring Harbor Symp. QUANT. Biol. 33, 129-143 (1968)
- Russell, R.L., Abelson, J.N., Landy, A., Gefter, M.L., Brenner, S., Smith, J.D.: Duplicate genes for tyrosine transfer RNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 47, 1-13 (1970)
- Ryan, M.J.: Coumermycin A1: A preferential inhibitor of replicative DNA synthesis in Escherichia coli I. In vivo characterization. *Biochemistry* 15, 3769-77 (1976)
- Sakakibara, Y., Tomizawa, J.: Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 802-806 (1974)
- Sakakibara, Y., Mizukami, T.: A temperature-sensitive Escherichia coli mutant defective in DNA replication: dnaN, a new gene adjacent to the dnaA gene. *Molec. gen. Genet.* 178, 541-554 (1980)
- Sato, K., Nishimune, Y., Sato, M., Numich, R., Matsushiro, A., Inokuchi, H., Ozeki, H.: Suppressor-sensitive mutants of coliphage $\phi 80$. *Virology* 34, 637-649 (1968)
- Schwartz, D.O., Beckwith, J.R.: Mutagens which cause deletions in Escherichia coli. *Genetics* 61, 371-376 (1969)
- Sharp, P.A., Hsu, M.T., Ohtsubo, E., Davidson, N.: Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of Escherichia coli I. Structure of F-prime factors. *J. Mol. Biol.* 71, 471-497 (1972)
- Studier, F.W.: Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gel. *J. Mol. Biol.* 79, 237-248 (1973)
- Sugimoto, K., Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., Nishimura, A., Yasuda, Y., Hirota, Y.: Nucleotide sequence of Escherichia coli K-12 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 575-579 (1979)

- Wechsler, J.A.: The genetics of E.coli replication. In: DNA synthesis, present and future (Moleneux, I., Kohiyama, M., eds.) , pp. 49-70 New York: Plenum, Publishing Corporation (1978)
- Weigle, J.: Assembly of phage lambda in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 1462-66 (1966)
- Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A.: RNA synthesis initiates in vitro conversion of M13 DNA to its replicative form. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 965-969 (1972)
- Yamagishi, H., Ozeki, H.: Comparative study of thermal inactivation of phage $\phi 80$ and lambda. Virology 48, 316-322 (1972)
- Yamagishi, H., Inokuchi, H., Ozeki, H.: Excision and duplication of $su3^+$ -transducing fragments carried by bacteriophage $\phi 80$ I. Novel structure of $\phi 80_{sus2psu3^+}$ DNA molecules. J. Virology 18, 1016-23 (1976a)
- Yamagishi, H., Inokuchi, H., Ozeki, H.: Excision and duplication of $su3^+$ -transducing fragments carried by bacteriophage $\phi 80$ II. Red- or Rec-dependent excision and duplication. J. Mol. Biol. 106, 133-150 (1976b)
- Yasuda, S., Hirota, Y.: Cloning and mapping of the replication origin of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5458-62 (1977)
- Yuasa, S., Sakakibara, Y.: Identification of dnaA and dnaN gene products of Escherichia coli. Molec. gen. Genet. 180, 267-273 (1980)

付章 材料と方法

(i) バクテリア株

用いたバクテリア株は、全て大腸菌 K12 株由来のものであり、表 4 に示している。

(ii) バクテリオファージ株

表 5 に示している。

(iii) 培地

用いた培地は下記の組成である。

(a) L 培地

ポリペプトン	10 gr.	/ 1 l (pH. 7.2)
イーストエキストラクト	5 gr.	
NaCl	5 gr.	
グルコース	1 gr.	

(b) M 培地

バクトリコクトン	10 gr.	/ 1 l (pH. 7.2)
NaCl	2.5 gr.	

Bacterial strains

Strain	Genotype ^a	Source, reference, construction
C600	<u>supE</u> , <u>tonA</u>	Appleyard (1954)
C600S	<u>tonB</u> ⁺ derivative of C600	Sato et al. (1968)
W594	<u>str</u> ^r derivative of W3350	Weigle (1966)
#153	<u>tnaA</u> , <u>ΔtrpA-E</u> , <u>tonB(Δtna)</u>	M. Riley
#153λ ⁻	λ-nonlysogen of #153	This work
LC343	<u>dnaA46</u> , <u>thy</u> , <u>leu</u> , <u>Δ[pro-lac]</u>	Y. Takeda
LC343 <u>str</u> ^r	<u>str</u> ^r derivative of LC343	Y. Takeda
LC343 <u>str</u> ^r <u>BF</u> ^r	<u>BF</u> ^r , <u>colE1</u> ^r derivative of LC343 <u>str</u> ^r	This work
NI7-9	HfrC, <u>trp</u> , <u>his</u> , <u>uvrA54</u> , <u>str</u> ^r	H. Ogawa
LC343 <u>str</u> ^r <u>uvrA</u>	<u>uvrA</u> derivative of LC343 <u>str</u> ^r	This work, NI7-9 x LC343 <u>str</u> ^r , select <u>leu</u> ⁺
CRT83	<u>dna-83</u> , <u>thy</u> , <u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>thi</u> , <u>flv</u> , <u>lac</u> , <u>mtl</u>	Hirota et al. (1970)
CRT83 <u>str</u> ^r	<u>str</u> ^r derivative of CRT83	This work
SH97	<u>dna-167</u> , <u>thr</u> , <u>trp</u> _{am} , <u>tyr</u> _{am} , <u>metE</u> , <u>thy</u> , <u>str</u> ^r	S. Hiraga
PC5	<u>dna-5</u> , <u>thy</u> , <u>leu</u> , <u>str</u> ^r	Carl (1970)
PC5 <u>lac</u> ⁻	<u>lac</u> _{am} derivative of PC5	This work, φ80 <u>p_{lac}</u> (Ohshima et al., 1973)- mediated <u>lac</u> ⁻ transductant, from CA274 <u>lac</u> ₁₂₅ _{am} (Russell et al., 1970)
N3-1	<u>trp</u> , <u>gal</u> , <u>str</u> ^r , <u>uvrB</u>	H. Ogawa
KL16-99	Hfr, <u>thi</u> , <u>rel</u> , <u>recA1</u> , <u>deoB</u>	Low (1968)
LC343 <u>str</u> ^r <u>recA1</u>	<u>recA1</u> derivative of LC343 <u>str</u> ^r	This work, KL16-99 x LC343 <u>str</u> ^r , select <u>thy</u> ⁺
CRT83 <u>str</u> ^r <u>recA1</u>	<u>recA1</u> derivative of CRT83 <u>str</u> ^r	This work, KL16-99 x CRT83 <u>str</u> ^r , select <u>thy</u> ⁺
SH97 <u>recA1</u>	<u>recA1</u> derivative of SH97	This work, KL16-99 x SH97, select <u>thy</u> ⁺
PC5 <u>recA1</u>	<u>recA1</u> derivative of PC5	This work, KL16-99 x PC5, select <u>thy</u> ⁺

-Continued-

(Strain)	(Genotype)	(Source, reference, construction)
C600/RSF2124	RSF2124; <u>colE1</u> , Tn3[<u>Ap^r</u>]	A. Oka
JC3912	<u>uvrA6</u> , <u>thyA</u> , <u>ilv</u> , <u>arg</u> , <u>metA</u> derivative of JC5422	T. Kato; Kato et al. (1977)
JC3913	<u>recF</u> derivative of JC3912	T. Kato; Kato et al. (1977)

^a For genetic symbols, see Bachmann and Low (1980).

表 5.

Phage strains

Strain	Source, reference
<u>λ</u> tna	Borck et al. (1976)
<u>λ</u> cI	J. Weigle
<u>λ</u> b5	G. Kellenberger
<u>λ</u> b2b5	"
<u>λ</u> b5c	H. Inokuchi
<u>λ</u> b2b5c	"
<u>λ</u> b5ind ⁻	This work
φ80sus2psu ⁺ 3 (used as the density marker)	Yamagishi et al. (1976b)
φ80Δ4 (" ")	" "

(c) M9 培地

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.1 gr.
KH_2PO_4	3 gr.
NaCl	5 gr.
NH_4Cl	1 gr.
MgSO_4	(1 mM)
CaCl_2	(0.1 mM)
FeCl_3	(1 μM)
チミン	1 mg.
糖	2g

1l

* 栄養要求性株を用いる場合には、必要に応じて、チミン酸 (各 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、或るいはチミン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加える。

(d) M9-M 培地

糖と 1%. マルトース 0.5% を含み、 MgSO_4 の代わりに MgCl_2 を用いる (1 mM)。他は (c) と同じ。

(e) 入上層寒天培地

寒天濃度 0.55% 以外は入寒天培地と同じ。

(f) 入寒天培地

ポリペプトン	10 gr.	/ 1ℓ (pH. 7.2)
イーストエキストラクト	0.5 gr.	
NaCl	2.5 gr.	
寒天	12 gr.	

(注) アニセツリン耐性菌の選抜には、20mg/ml
のアニセツリンを加えた入培地を用いた。

(g) 稀釈液

ポリペプトン	1 gr.	/ 1ℓ (pH. 7.4)
NaCl	3 gr.	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 gr.	

(h) トリス-Mg バッファー (ファージ吸着用)

MgSO ₄	10 mM
CaCl ₂	0.5 mM
ゼラチン	0.001%
トリス-塩酸バッファー (pH 7.4)	10 mM

(iv) Int-アッセイ

0. Niwa の方法に拠る。つき揚子で対象とする λ -ファージの ϕ ーフセンタ-をつまみし、 λ b2 b5 c (対象とする λ -ファージが imm^2 の場合) を含む (約 10^8 / dish) λ 軟寒天培地 (寒天濃度は 0.3%) に移す。Int⁺ λ -ファージは明瞭な量をつくり、Int⁻ λ -ファージはつくらない。

(v) 形態導入

Tna A : Gartner and Riley (1965) の方法に従った。インドール ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) と 5-メチルトリプトファン ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む M9-グリセロール寒天培地上に、#153 λ^- [tnaA^- , strpA-E] を軟寒天と共にプレートし、その上に少量の λ -ファージ液をスポットする。Tna⁺ 菌のマイクロニーを作る。

Dna A : λ 寒天培地上に、LC 343 [dnaA46] をプレートし、 λ -ファージ液をスポットする。

42°C でマイクロニーを作るための Dna⁺ である。

Rec F : JC 3913 [uvrA^- , recF^-] 菌に、 λ -ファージ

と感染させた後、入寒天培地に浸み込ませる。UV照射 (40 erg/mm^2 : $\text{UvrA}^- \text{recF}^-$ 菌と $\text{UvrA}^- \text{recF}^+$ 菌と区別するものに最適な総量) 後、コロニーを作るものが RecF^+ である。

(vi) 電子顕微鏡によるヘテロ二重鎖 DNA の観察

ヘテロ二重鎖 DNA の形成法は Sharp et al. (1972) の方法に基づく。対象とする二種類の精製した λ 粒子を混ぜ合わせ、アルカリ性にする。ことにより、DNA を放出・変性させる。次いで、中和し、70%ホルムアミド中でハイジュリゲイジさせる。DNA の展開法は Yamagishi et al. (1976a) に拠る。観察は写真撮影は、JEM-7A 電子顕微鏡で行う。10,000 倍で撮影したものを、10 倍に拡大し、長さ測定した。測定の基準とするために、 $\phi\lambda\text{RFII}$ (二本鎖)、 $\phi\lambda\text{SS}$ (一本鎖) DNA を試料に加えた。 λ DNA は 48,000 塩基対とし (Fiandt et al., 1977)、 $\phi\lambda$ DNA は λ DNA の $13.3 \pm 0.3\%$ とした。ヘテロ二重鎖の非相同部分の DNA が、それぞれど

これらのアークDNAに由来するものは、浮遊密度に基づいて決定した。

(VII) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動とオートラジオグラフ。

[³⁵S]-メチオニンで標識された細胞を、100μg/mlのメチオニンを加えて、標識を停止した後、集菌して、SDS-サンポルバッファーに懸濁する(Studier, 1973)。2分間、100°Cにした後、電気泳動する。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動はLaemmli (1970)が開発した不連続バッファー法で行なった。濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は、3%、分離ゲルは12.5% あるいは10%である。泳動後、フルオログラフ(Bonner and Laskey, 1974)を行ない、更に、フィルム(Coatex X-Omat R)にフラッシュを当て、増感紙(極光、HS)を用いて、増感オートラジオグラフをとった(Laskey and Mills, 1975)。分子量の測定のために、マーカー蛋白質を同時に泳動した。あるいは、分子量既知(Murialdo

(68)

and Siminovitch, 1972) の入蛋白質を用いた。